Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Zur taxonomischen Wertigkeit chemischer Merkmale: Flavonoide aus Vitex agnus castus L. und Helichrysum bracteatum (VENT.) WILLD.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Horst Rimpler

aus Berlin

1965

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Zur taxonomischen Wertigkeit chemischer Merkmale: Flavonoide aus Vitex agnus castus L. und Helichrysum bracteatum (VENT.) WILLD.

ACAD.
LUGD. BAT.
BIBL.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Horst Rimpler

aus Berlin

Referent: Professor Dr. R. Hänsel
Korreferent: Professor Dr. G. Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1964

Tag der Promotion: 27. Feb. 1965

Dem Andenken meines Vaters gewidmet

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R. HÄNSEL durchgeführt.

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. R. HÄNSEL, für die Anregung, das vorliegende Thema zu bearbeiten und für das große Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, vor allem aber für seine wertvollen Ratschläge und seine stete wissenschaftliche Förderung herzlich zu danken.

Mein besonderer Dank gilt auch all denen, die sich in liebenswürdiger Weise um die Erfüllung meiner kleinen und großen Wünsche bemühten, vor allem:

Herrn Dr. E. WINDE, ehemals wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin für seine wertvollen Ratschläge und Hinweise,

Herrn Dr. H. RICHTER, Leiter der Abteilung Pharmazie der Firma SCHERING AG Berlin, für die Extraktion größerer Mengen Blattdroge von Vitex agnus castus,

Herrn Dr. H. GNICHTEL, wissenschaftlicher Rat am Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin, für die Erlaubnis zur Aufnahme der IR-Spektren.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I	Einleitung und Problemstellung	8
II	Botanik der untersuchten Vitex- und Helichrysum-Arten	10
III	Bisherige Untersuchungen über das Vorkommen von Flavonoiden in den Arten Vitex agnus castus L., Vitex megapotamica (Spreng.) Moldenke, Vitex trifolia L., Vitex negundo L. und Helichrysum bracteatum (Vent.) Willd.	13
IV	Methoden zur Strukturaufklärung von Flavonoiden .	16
	a) Allgemeines	16
	b) Der Alkaliabbau von Flavonoiden	18
	c) Das Gleichgewicht Flavanon ⇌ Chalkon	22
	d) Synthese von Chalkonen	27
V	Eigene Untersuchungen:	30
	H a u p t t e i l	30
	A) Die Flavone von Vitex agnus castus L.:	31
	1. Verbindung F_3:	31
	a) Isolierung aus den Früchten von Vitex agnus castus.	31
	b) Identifizierung als 3',5-Dihydroxy-3,4',6,7-tetramethoxyflavon	31
	2. Verbindung F_1:	34
	a) Isolierung aus den Blättern von Vitex agnus castus.	34
	b) Identifizierung als Homo-Orientin.	35
	B) Zwei neue Chalkonglykoside aus Helichrysum bracteatum (VENT.) WILLD.:	39
	1. Isolierung der Verbindungen A und B aus den Hüllblättern einer gelben Sorte von Helichrysum bracteatum (VENT.) WILLD.	39
	2. Gewinnung des Aglykons der Verbindung B (F_B)	43
	3. Identifizierung der Verbindung A:	43
	a) Charakterisierung durch analytische Methoden	43

Seite

b) Synthese des 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxychalkons und Vergleich mit der natürlichen Verbindung A. 45

4. Identifizierung der Verbindung B: 47

a) Charakterisierung durch analytische Methoden. 47

b) Synthese des 2'-Glucosyloxy-3,4,4',5,6'-pentahydroxychalkons und Vergleich mit der natürlichen Verbindung B. 51

Experimenteller Teil: . . . 54

Allgemeines: 55

A) Die Flavone von Vitex agnus castus L.: 56

1. Verbindung F_3: 56

a) Isolierung aus den Früchten von Vitex agnus castus. 56

b) Entmethylierung. 56

c) Methylierung. 57

d) Alkalispaltung. 58

2. Verbindung F_1: 60

a) Isolierung aus den Blättern von Vitex agnus castus L. 60

b) Enzymatische Hydrolyse. 62

c) Säure-Hydrolyse: 62

α) Prüfung auf Zucker 62

ß) Prüfung auf Flavonoide (Aglyka) . . . 63

d) Abtrennung des Isomerisierungsproduktes F_i von F_1. 63

e) Partielle Rückverwandlung des Isomerisierungsproduktes F_i in F_1. 64

f) Reduktive Spaltung der C-glykosidischen Bindung von F_1. 65

B) Die Chalkonglykoside von Helichrysum bracteatum (VENT.) WILLD.: 66

1. Isolierung der Verbindungen A und B aus den Hüllblättern einer gelben Sorte von Helichrysum bracteatum. 66

2. Identifizierung der Verbindung A: 71

Seite

a) Acetylierung. 71
b) Säure-Hydrolyse: 71
α) Isolierung des Aglykons F_A 71
ß) Acetylierung des Aglykons F_A 72
γ) Alkalispaltung von F_A 72
δ) Nachweis des Zuckers 73
c) Synthese des 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxychalkons: 74
α) 4-Benzoylphloracetophenon 74
ß) 2-[Tetraacetyl-D-glucosido]-4-benzoyl-phloracetophenon 75
γ) 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxy-chalkon 76
δ) Acetylierung des synthetischen 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxychalkons 77
3. Identifizierung der Verbindung B: 78
a) Alkalispaltung. 78
b) Gewinnung des Aglykons F_B. 79
c) Acetylierung von F_B. 80
d) Synthese des 2'-Glucosyloxy-3,4,4',5,6'-pentahydroxychalkons. 80

VI Diskussion 83

VII Zusammenfassung 87

VIII Literaturverzeichnis 88

IX Lebenslauf 91

I. Einleitung und Problemstellung:

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung zweier Flavonoide aus Vitex agnus castus und der Strukturaufklärung zweier bisher unbekannter Chalkonglykoside aus Helichrysum bracteatum. Mit den vorgelegten Befunden wird das Material über Vorkommen und Struktur der in beiden Arten nachweisbaren Flavonoide vervollständigt, so daß die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen mit den früher gewonnenen Kenntnissen herangezogen werden können, um das Problem der taxonomischen Wertigkeit chemischer Merkmale an einem Beispiel zu diskutieren.

WETTSTEIN erwähnt bereits 1935 in seinem "Handbuch der systematischen Botanik", daß neben der Phytopaläontologie, der vergleichenden Morphologie, dem Studium der individuellen Entwicklung, der Pflanzengeographie, der Zytologie und der Physiologie auch die Chemie zur Erkenntnis der Phylogenie beitragen kann und daher zu den Methoden der phylogenetischen Systematik zu rechnen ist. Diese Gleichstellung der Chemie mit den anderen Disziplinen verleitet dazu, ein chemisches Merkmal wie beliebige andere Merkmale anzusehen, sie festzustellen und dann die erhobenen Befunde statistisch auszuwerten. Erst in neuerer Zeit beginnt man sich über die Wertigkeit chemischer Merkmale in der Taxonomie Gedanken zu machen. So gelangt z.B. HARBORNE (1964) in einer uns grundlegend erscheinenden Arbeit dazu, vier Anforderungen an ein taxonomisch verwertbares Merkmal zu stellen:

1.) Das Merkmal soll innerhalb der untersuchten Pflanzengruppe variieren; durchgängig vorhandene oder nicht vorhandene Merkmale sind wertlos.

2.) Die gegensätzlichen Ausprägungen eines Merkmales sollen beide in der untersuchten Pflanzengruppe mit vergleichbarer Frequenz auftreten.

3.) Streng korrelierte Merkmale sind als ein komplexes Merkmal zu werten, so daß der taxonomische Wert geringer ist als wenn die Merkmale unkorreliert wären. Die Korrelation der Merkmale kann entweder durch einen funktionalen Zusammenhang oder durch

gemeinsame Selektion und evulutionäre Divergenz bedingt sein.

4.) Das Merkmal soll wenig durch die Umgebung beeinflußt werden und einfach zu bestimmen sein.

Zwar gelten diese Forderungen allgemein, sie auf chemische Merkmale anzuwenden bietet jedoch (u.U. mit Ausnahme der leichten Bestimmbarkeit) weder praktische noch theoretische Schwierigkeiten. Die dritte Forderung verdient allerdings besondere Beachtung: Vermutlich denkt HARBORNE hier an Korrelationen morphologischer mit morphologischen oder auch chemischer mit chemischen Merkmalen. Uns erscheint es jedoch wichtig, gerade eine weitere Möglichkeit, nämlich die Korrelation eines chemischen mit einem morphologischen Merkmal, genauer zu untersuchen. Auf diesen Spezialfall, der für die Problemstellung der vorliegenden Arbeit bedeutsam ist, soll daher im folgenden etwas näher eingegangen werden.

Zunächst soll noch einmal festgestellt werden: Ist eine Korrelation zwischen einem chemischen und einem morphologischen Merkmal nachzuweisen oder wahrscheinlich zu machen, und ist diese Korrelation auf einen funktionalen Zusammenhang der beiden Merkmale zurückzuführen, so ist das betreffende chemische Merkmal taxonomisch wertlos, da es ja nur einen anderen Ausdruck für das bereits bekannte morphologische Merkmal darstellt. Von den chemischen Merkmalen soll im folgenden nur das Vorkommen sekundärer Pflanzenstoffe, insbesondere solcher mit Exkretnatur im weitesten Sinne (REZNIK, 1960) untersucht werden; als morphologische Merkmale sollen dazu die den Exkretionsmechanismen zugrundeliegenden morphologisch-anatomischen Strukturen herangezogen werden. Den Begriff Exkretionsmechanismus fassen wir sehr weit: Wir unterscheiden mit REZNIK (1959) die chymotrope und die membranotrope Exkretion und wir ergänzen noch die Exkretion in anatomisch differenzierte Drüsen (glandulotrope Exkretion) und die Exkretion durch die Epidermis. Für die Diskussion der vorliegenden Untersuchungsergebnisse werden beide Begriffe noch weiter spezifiziert: Von den pflanzlichen Exkreten sollen nur die Flavonoide, als deren verbreitetste Vertreter, und von den vier möglichen Exkre-

tionsmechanismen nur zwei, die chymotrope und die glandulotrope Exkretion, in die Diskussion einbezogen werden. Wir wollen also Beispiele bringen für Korrelationen zwischen dem Vorkommen bestimmter Flavonoide und dem Vorhandensein (oder Fehlen) anatomisch differenzierter Drüsen.

Besitzt eine Pflanze Drüsen, so hat sie damit die Möglichkeit, lipophile Metaboliten in diese Organe auszuscheiden. Derartige Exkrete, die ätherischen Öle, enthalten fast immer Terpene. Man weiß aber auch, daß andere Stoffe (z.B. Phenylpropane), wenn sie lipophil genug sind, ebenfalls in den Drüsen vorkommen können. Unsere Hypothese (HÄNSEL, 1962) geht nun dahin, daß generell pflanzliche Exkrete, in unserem Falle die Flavonoide, der glandulotropen Exkretion angepaßt, d.h. "lipophilisiert" werden können. Anhaltspunkte für die Gültigkeit dieser Hypothese wurden bereits gefunden (vergl. HÄNSEL, 1962). Man sollte also erwarten, daß eine Korrelation zwischen dem Vorkommen lipophiler Flavonoide und dem Vorhandensein von Drüsen besteht. Andererseits sollte die ubiquitäre Möglichkeit zur chymotropen Exkretion mit dem Vorkommen hydrophiler Flavonoide korreliert sein.

II. Botanik der untersuchten Vitex- und Helichrysum-Arten.

A) Vitex-Arten:

Die Gattung Vitex wird nach BRIQUET (1897) der Unterfamilie Viticoideae in der Familie der Verbenaceae zugeordnet. Sie umfaßt etwa 380 Arten und Unterarten, die vorwiegend in den Tropen und Subtropen der Alten und Neuen Welt verbreitet sind; wenige Arten finden sich in den gemäßigten Zonen Europas und Asiens. Fast alle Arten sind kahle, behaarte oder filzige Sträucher oder Bäume mit gegenständigen, meist aus 3-7 Blättchen zusammengesetzten Blättern. Die Blättchen sind ganzrandig oder gezähnt, dünn oder ledrig. Die Infloreszenzen sind zymös. Die Zymen sind kurz und gedrängtblütig oder locker und stark entwickelt; sie sind entweder blattachselständig (sitzend oder gestielt) oder sie sind terminal zu traubigen oder rispigen Blütenständen höherer Ordnung zusammengefaßt. Die Blüten sind weiß, blau, violett oder gelblich, die Brakteen meist klein und unscheinbar. Der Kelch ist glockig, seltener röhrig,

meist 5-zähnig oder 5-spaltig. Die Blumenkrone besitzt eine zylindrische, nach oben etwas erweiterte Röhre; der Saum ist ausgebreitet, schief, schwach zweilippig, 5-spaltig; die zwei hinteren Lappen sind kurz, die seitlichen größer, der vordere ist sehr groß. Das Androzeum besteht aus 4 didynamischen, in der Kronröhre inserierten Staubblättern. Der Fruchtknoten wird aus zwei zweifächrigen Karpellen gebildet; in jedem Fach befindet sich eine Samenanlage. Der Griffel ist kurz mit zweispaltigem Gipfel. Die oft auf einem vergrößerten Kelch sitzende Steinfrucht besteht aus einem mehr oder weniger saftigen Exokarp und einem harten oder knochigen 4-fächrigen Endokarp. (MOLDENKE, 1955 a).

Folgende Vitex-Arten sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Bedeutung: 1.) Vitex agnus castus L., Sp. Pl., ed. 1, 638 ("Agnus Castus"), 1753; Schau., in A.DC., Prodr. 11 : 684, 1847. 2.) Vitex megapotamica (Spreng.) Moldenke, Am. Journ. Bot. 38, 327, 1951. 3.) Vitex trifolia L., Sp. Pl., ed. 1, 638 ("trifoliis"), 1753. 4.) Vitex negundo L., Sp. Pl., ed. 1, 638, 1753. Ausführliche Beschreibungen der aufgeführten Arten finden sich bei MOLDENKE 1955 b (V. agnus castus), 1957 a (V. megapotamica), 1957 b (V. negundo) und 1958 (V. trifolia). Im folgenden soll daher nur kurz auf die Verbreitung und einige wichtige Merkmale eingegangen werden.

Vitex agnus castus ist eine strauchartige, manchmal auch baumartige Pflanze, die auf der Krim, an den Küsten des Mittelmeeres und in den nördlichen Randgebieten des afrikanischen Kontinents beheimatet ist. Die Art wurde schon früh in Kultur genommen und ist heute in allen warmen Zonen Asiens, Afrikas und Amerikas anzutreffen. Die Blättchen dieser Art sind auf der Oberseite mehr oder weniger staubig behaart oder unbehaart, auf der Unterseite dicht kurz behaart oder filzig. (MOLDENKE, 1955 b). BREITWIESER (1942) findet auf den Blättchen u.a. drei verschiedene Arten von Drüsenhaaren, von denen vor allem die in Aufsicht "kleeblattartigen" sehr zahlreich vorhanden sind.

Vitex megapotamica ist ein mittelgroßer Baum, der in Südbrasilien, Paraguay und im nördlichen Teil Argentiniens beheimatet

ist. Die Blättchen dieser Art sind auf der Oberseite unbehaart, auf der Unterseite sehr schwach behaart. (MOLDENKE, 1957 a). SCHAAF (1964) konnte nur auf der Unterseite dieser Blättchen sehr wenige "kleeblattartige" Drüsenhaare nachweisen (durchschnittlich 3,44 Drüsenhaare pro mm^2. Zum Vergleich: Bei V. agnus castus findet man durchschnittlich 61,1 Drüsenhaare pro mm^2).

Vitex trifolia ist ein Strauch oder ein strauchartiger Baum. Man findet diese Art überall in den tropischen Zonen Asiens von Madagaskar im Westen über Afghanistan, Indien, das südliche China, Japan, die Philippinen, Indonesien bis nach Neuguinea, Australien und den Fidji-Inseln im Osten. Die Blättchen dieser Art sind auf der Oberseite schwach staubig behaart und mehr oder weniger harzig punktiert, verkahlend, manchmal aber auch dichter behaart und weißfilzig an den Rändern; auf der Unterseite sind sie dicht filzig behaart mit weißen oder grauen Haaren. (MOLDENKE, 1958). BREITWIESER (1942) findet auf den Blättchen von V. trifolia, var. unifoliata Schau. u. a. mehrzellige gelbe Drüsenhaare.

Vitex negundo ist eine strauchartige oder auch baumartige Pflanze, die in den tropischen Zonen Asiens und Ostafrikas beheimatet ist. Das Verbreitungsgebiet der Wildpflanze deckt sich weitgehend mit dem der Vitex trifolia. V. negundo wird jedoch viel in Europa, Asien, Nordamerika und Westindien kultiviert. Die Blättchen dieser Art sind auf der Oberseite schwach behaart oder unbehaart, auf der Unterseite dicht angedrückt behaart. (MOLDENKE, 1957 b). BREITWIESER (1942) findet auf den Blättchen von V. negundo var. incisa C.B.Clarke u. a. zwei Arten von Drüsenhaaren, von denen die "kleeblattartigen" sehr zahlreich vorhanden sind.

B) Helichrysum bracteatum:

Helichrysum bracteatum (Vent.) Willd., Enumeratio Pl. Hort. Berolin. II, Berlin 1809, p. 869.

Helichrysum bracteatum, die Gartenstrohblume, die zur Unterfamilie der Tubuliflorae in der Familie der Compositae gehört, ist eine krautige Pflanze mit aufrechten, oberwärts ästigen Stengeln; sie wird 20 bis 120 cm hoch. Die Laubblätter sind spitz-lanzettlich

und am Rande etwas ausgeschweift. Die 2 bis 5 cm breiten Blütenköpfchen stehen einzeln oder sind zu einer lockeren Doldentraube vereinigt. Sie werden von zahlreichen trockenhäutigen, vielreihig und dachziegelartig angeordneten und auffällig gefärbten Hüllschuppen umgeben. Die inneren Hüllschuppen sind mit einer gelenkartig abgebogenen und strahlig ausgebreiteten Spitze versehen. Jedes Köpfchen enthält zahlreiche Scheibenblüten; die äußeren sind rein weiblich. Die Wildpflanze, die stroh- bis goldgelbe Hüllblätter besitzt, ist in Australien beheimatet. (BENTHAM, 1866). Die Art wird viel als Zierpflanze kultiviert; so gibt es eine ganze Reihe von Farbsorten, deren Hüllblätter nicht nur gelb, sondern z.B. orange, braun, rosa oder violett gefärbt sind.

III. Bisherige Untersuchungen über das Vorkommen von Flavonoiden in den Arten Vitex agnus castus L., Vitex megapotamica (Spreng.) Moldenke, Vitex trifolia L., Vitex negundo L. und Helichrysum bracteatum (Vent.) Willd.:

A) Vitex agnus castus:

Aus den Blättern von V. agnus castus wurden von SIRAIT (1961) drei Flavonoide in kristalliner Form isoliert und folgendermaßen charakterisiert (vergl.a.S.31): F_1 " Flavonglucosid, Aglykon nicht identifiziert; F_2 = Luteolin-7-glucosid; F_3 = Flavonaglykon, Struktur nicht näher untersucht.

Etwa gleichzeitig isolierten BELIC, BERGANT-DOLAR u. MORTON (1961) aus den Früchten von V. agnus castus das bis dahin unbekannte 3',5-Dihydroxy-3,4',6,7-tetramethoxyflavon, für das sie den Namen Casticin vorschlagen. Dieses Casticin ist offensichtlich identisch mit SIRAIT's Verbindung F_3. Wir erfuhren von der zitierten Arbeit jedoch erst, als meine eigenen, 1960 begonnenen Untersuchungen über die Struktur der Verbindung F_3 fast abgeschlossen waren (vergl.a. SIRAIT, RIMPLER u. HÄNSEL, 1962).

B) Vitex megapotamica:

SCHAAF (1964) isolierte aus den Blättern von V. megapotamica Luteolin-7-glucosid und Orientin, ein 8- (oder 6-) Glucopyranosyl-Luteolin (n. KOEPPEN 1964, sowie KOEPPEN u. ROUX 1964). Ein

drittes Flavon, das nur in geringer Menge vorlag, wurde papierchromatographisch als Homo-Orientin, ein 6- (oder 8-) Glucopyranosyl-Luteolin (n. KOEPPEN 1964, sowie KOEPPEN u. ROUX 1964), identifiziert.

C) Vitex trifolia:

Nach papierchromatographischen Untersuchungen von SIRAIT (1961) enthalten die Blätter von V. trifolia die gleichen Flavonoide wie V. agnus castus: F_1, F_2 (= Luteolin-7-glucosid) und F_3 (= Casticin).

D) Vitex negundo:

Auch in den Blättern von V. negundo konnte SIRAIT (1961) papierchromatographisch die Flavonoide F_1, F_2 (= Luteolin-7-glucosid) und F_3 (= Casticin) nachweisen.

E) Helichrysum bracteatum:

Erstmals untersucht ROSOLL (1884) den gelben Farbstoff der Blütenköpfchen von Helichrysum bracteatum var. monstrosum, den er Helichrysin nannte. Er konnte ihn jedoch nur in Form einer dunkelgelben, amorphen, harzartig glänzenden Masse gewinnen. Für den Farbstoff ist charakteristisch, daß er sowohl mit Mineralsäuren als auch mit Alkalien eine purpurrote Färbung gibt, die bei sorgfältigem Neutralisieren wieder in Gelb übergeht. Vor allem aus dieser Farbreaktion schloß er, daß es sich um einen neuartigen, bis dahin unbekannten Blütenfarbstoff handeln müsse. Durch histochemische Untersuchungen stellte er fest, daß der Farbstoff in den älteren Hüllblättern, deren Zellen bereits abgestorben sind; in der Membran gespeichert ist; in den jüngeren Blättchen findet er ihn an das Protoplasma gebunden. KLEIN (1921), der diese Angaben nochmals überprüfte, stellte dagegen fest, daß die noch lebenden Zellen der jungen Hüllblätter den Farbstoff im Zellsaft gelöst enthalten; in den toten Zellen der ausgewachsenen Hüllblätter findet er ihn ebenfalls in der Membran. KLEIN (1920 u. 1921) erkannte auch, daß das Helichrysin zur Dahlia-Gruppe der von ihm untersuchten Anthochlorfarbstoffe gehört, von denen er bereits annahm, daß sie "höchstwahrscheinlich

Flavonabkömmlinge" sind.+)

Es gelang jedoch erst 1962 ALBRECHT, aus den Blütenköpfchen einer gelben Sorte von Helichrysum bracteatum eines der Anthochlorpigmente in reiner Form zu isolieren und als Auronderivat zu identifizieren. Die Struktur dieses Farbstoffes, für den der Name Bractein vorgeschlagen wurde, konnte wenig später von HÄNSEL u. LANGHAMMER (1963) aufgeklärt werden: es handelte sich um das bis dahin unbekannte 3',4,4',5',6-Pentahydroxyauron-4-glucosid. Außer dem Bractein isolierte ALBRECHT (1962) aus der gleichen Droge noch das Luteolin-7-glucosid.

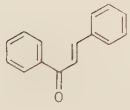
1963 konnte FRENZEL bei einer vergleichenden Untersuchung von 6 Kultursorten von Helichrysum bracteatum, die sich durch die Farbe ihrer Involukra unterscheiden, in den gelben, orangeroten und braunen Blütenköpfchen zwei weitere Anthochlorpigmente nachweisen und als Polyhydroxychalkonglykoside identifizieren. Eine dieser Verbindungen (Chalkonglykosid B) wurde in reiner Form isoliert und etwas näher charakterisiert; es konnten Anhaltspunkte dafür erbracht werden (vergl.a.S.50), daß es sich um ein dem Bractein strukturanaloges Chalkonglykosid (ein 2',3,4,4',5,6'-Hexahydroxychalkonglykosid) handelt. Außerdem wies FRENZEL (1963) in den Pappushaaren, Laubblättern und Hüllblättern der verschiedenen Sorten noch folgende Flavonoide nach: Luteolin, Orientin, Homo-Orientin, ein Homo-Orientinglykosid, ein Apigeninglykosid, Quercetin und ein Cyanidinglykosid.

+) Diese Annahme wurde später bestätigt: Die Anthochlore der Dahlia-Gruppe erwiesen sich entweder als Chalkon- oder als Auron-Derivate; diese beiden Untergruppen der Flavonoide werden daher noch heute unter dem Begriff "Anthochlorpigmente" zusammengefaßt.

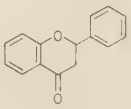
IV. Methoden zur Strukturaufklärung von Flavonoiden.

a) Allgemeines:

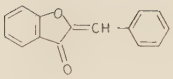
Unter Flavonoiden versteht man Pflanzenstoffe (und deren synthetische Analoga), deren Grundkörper aus 15 C-Atomen bestehen, die nach dem Schema C_6-C_3-C_6 miteinander verknüpft sind. Die beiden C_6-Einheiten liegen immer als aromatische Ringe vor, während die zentrale C_3-Einheit sowohl offenkettig vorliegen als auch zu einem 5- oder 6-gliedrigen sauerstoffhaltigen Heterocyclus geschlossen sein kann. Nach der Ausgestaltung der C_3-Einheit teilt man daher die Falvonoide in mehrere Untergruppen ein, von denen die wichtigsten auf der Abb. 1 dargestellt sind.



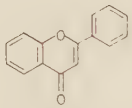
Chalkon



Flavanon



Auron



Flavon

Abbildung 1

Die Grundkörper der wichtigsten Flavonoidtypen.

Die Grundkörper selbst kommen allerdings in der Natur kaum vor; dagegen sind substituierte Flavonoide, insbesondere Flavone, im Pflanzenreich sehr weit verbreitet. Als Substituenten findet man vor allem Hydroxy-, Methoxy- und Glykosyloxygruppen, weniger häufig Methylendioxygruppen sowie C-Alkyl- und C-Glykosylreste. Die Methoden zur Strukturaufklärung von Flavonoiden kann man demnach in zwei Gruppen einteilen: in Methoden zur Ermittlung des Grundgerüsts und in Methoden zur Bestimmung der Art, Zahl und Stellung der Substituenten.

Die Ermittlung des Grundgerüsts, d.h. der qualitative Nachweis der einzelnen Flavonoidtypen, ist relativ einfach. Meist gelingt es schon durch eine papierchromatographische Untersuchung festzustellen, ob eine unbekannte Verbindung zu einer der folgenden Untergruppen der Flavonoide gehört (SEIKEL 1962): 1. Anthocyane, 2. Flavone und Flavonole (3-Hydroxyflavone), 3. Chalkone und Aurone, 4. Flavanone, Isoflavone und Catechine. Man benutzt dazu ein Standardlaufmittel (z.B. Butanol/Essigsäure/Wasser, 4:1:5) und wertet die Laufhöhe sowie die Farbe der Flecken im Tages- und UV-Licht vor und nach dem Behandeln mit Ammoniak aus. Zur näheren Charakterisierung können dann noch spezifischere Sprühreagenzien und - wenn die Verbindung in reiner Form vorliegt - weitere Farbreaktionen (s. VENKATARAMAN 1962) sowie die UV-Spektren (s.JURD 1962) herangezogen werden. Durch geeignete Kombination dieser Methoden gelingt es fast immer, den Grundkörper eines Flavonoids einwandfrei zu bestimmen.

Die Bestimmung der Art, Zahl und Stellung der Substituenten gestaltet sich meist schwieriger. Sie erfordert, wenn es sich um eine unbekannte Variante handelt, im allgemeinen die Isolierung der Verbindung in kristalliner Form und die Durchführung von Elementaranalyse sowie Methoxyl- und gegebenenfalls C-Methylbestimmungen. Auch die Zahl freier Hydroxygruppen wird man dann - meist durch Acetylierung, saure Verseifung des Acetats und anschließende Titration der entstandenen Essigsäure - bestimmen. Auch die UV-Spektren liefern, besonders wenn sie in Gegenwart basischer oder komplexbildender Reagenzien aufgenommen werden,

wertvolle Hinweise auf das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Strukturen (z.B. o-Dihydroxygruppierungen, sowie Hydroxygruppen in 7-, 5- und 3-Stellung, JURD 1962). Läßt der Rf-Wert der unbekannten Verbindung in einem Standardlaufmittel, die Summenformel oder andere Kriterien auf das Vorliegen eines Glykosides schließen, so wird man außerdem eine Säurehydrolyse durchführen und den abgespaltenen Zucker sowie das Aglykon nachzuweisen und zu identifizieren suchen. Hat man auf diese Weise einen Überblick über die Art, Zahl und mögliche Anordnung der Substituenten erhalten, so wird man versuchen, die Verbindung durch einfache Reaktionen (z.B. Methylierung oder Entmethylierung) in ein bereits bekanntes Flavonoid zu überführen. Gelingt das nicht oder ist auch damit (z.B. bei partiell methylierten Polyhydroxyflavonoiden) die Struktur der unbekannten Verbindung noch nicht völlig geklärt, so muß man eine Abbaureaktion durchführen und die Spaltprodukte identifizieren. Hierfür kommt praktisch nur der Alkaliabbau in Frage, der wegen seiner großen Bedeutung für die Strukturaufklärung der Flavonoide etwas ausführlicher besprochen werden soll.

Bei der Identifizierung von Chalkonen und Flavanonen, die durch eine säure- und basenkatalysierte Gleichgewichtsreaktion miteinander verknüpft sind, kann außerdem auch die Umwandlung des einen Flavonoidtyps in den anderen wichtige Hinweise auf die Struktur geben. Da diese Umwandlung für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung war, soll sie ebenfalls näher besprochen werden.

Die mit analytischen Methoden ermittelte Struktur sollte schließlich, wenn es sich um eine noch nicht bekannte Verbindung handelt, durch Synthese gesichert werden. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei Chalkone synthetisiert wurden, soll auch diese Reaktion etwas näher erläutert werden.

b) Der Alkaliabbau von Flavonoiden:

PICCARD führte bereits 1877 einen Alkaliabbau des Flavons Chrysin durch, doch erst KOSTANECKI erkannte bei einer Wiederholung dieses Versuchs (1893) die große Bedeutung der Reaktion, die er dann bei seinen späteren, für die Flavonchemie grundlegenden

Untersuchungen systematisch anwandte. KOSTANECKI leitete aus den erhaltenen 4 Spaltprodukten Phloroglucin, Essigsäure, Benzoesäure und wenig Acetophenon die damals noch unbekannte Struktur des Chrysins ab, indem er folgenden Reaktionsverlauf annahm (s.a.Abb. 2). Zunächst wird der γ-Pyronring des Flavons unter Bildung eines ß-Diketons geöffnet, das dann nach Art der "Säurespaltung" eines ß-Ketoesters in ein Acetophenon- und ein Benzoesäure-Derivat gespalten wird. An welcher der beiden Ketogruppen die Spaltung stattfindet, hängt von den Substituenten und auch von den Reaktionsbedingungen ab (DEAN 1963); meistens entsteht jedoch aus dem B-Ring überwiegend die aromatische Säure. Aus dem A-Ring entsteht dementsprechend meist ein Acetophenonderivat, das jedoch unter den drastischen Bedingungen, die zum Abbau von Flavonen notwendig sind (siedende 30-50%ige Kalilauge für einige Stunden oder Kaliumhydroxydschmelze bei 210° für 15 Minuten), noch weiter in Essigsäure und das entsprechende Phenol gespalten wird. Auch eine eventuell entstehende Phloroglucincarbonsäure wird unter diesen Bedingungen in Kohlendioxyd und das Phenol gespalten.

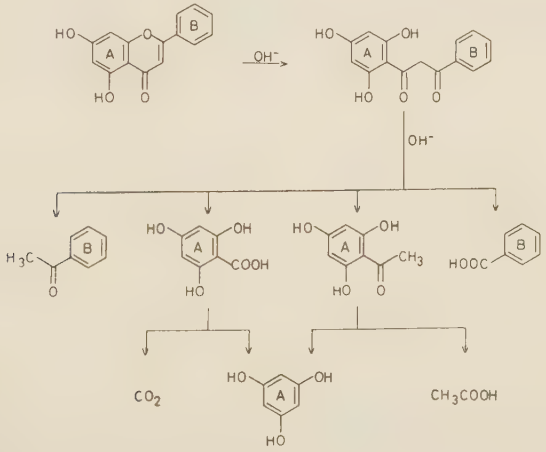


Abbildung 2

Verlauf des Alkaliabbaus bei Flavonen, dargestellt am Beispiel des Chrysins (KOSTANECKI 1893; Schema nach DEAN 1963)

Flavonole (3-Hydroxyflavone) verhalten sich beim Alkaliabbau etwas anders als die Flavone. Bei der Öffnung des γ-Pyronringes entstehen aus diesen Verbindungen 2-Hydroxy-1,3-Diketone, die sehr instabil sind und sofort oxydativ abgebaut werden, so daß aus beiden aromatischen Ringen des Flavonols Phenolcarbonsäuren oder deren Decarboxylierungsprodukte gebildet werden (DEAN 1963). Ist die 3-Hydroxygruppe dagegen veraethert, so verläuft die Spaltung schon unter wesentlich milderen Bedingungen (10-30%ige wäßrige oder alkoholische Kalilauge) und liefert dann die "normalen" Spaltprodukte: das dem A-Ring entsprechende ω-Alkoxyacetophenon-Derivat und die dem B-Ring entsprechende aromatische Säure (s.Abb. 3).

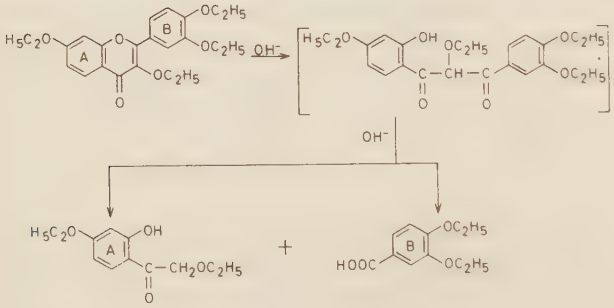


Abbildung 3

Verlauf des Alkaliabbaus bei Flavonol-3-alkylaethern; dargestellt am Beispiel des Fisetin-tetraaethylaethers (HERZIG 1894)

Bei den Chalkonen, die keinen Heterocyclus enthalten, verläuft der Alkaliabbau noch anders. Der Angriff der Hydroxylionen kann hier an zwei verschiedenen Stellen erfolgen: an der Carbonylgruppe und an der nicht aromatischen Doppelbindung. Wo er erfolgt, hängt hauptsächlich von der Alkalikonzentration ab: Bei der Einwirkung wäßriger oder alkoholischer Natronlauge unter relativ milden Bedingungen wird hauptsächlich die C-C Doppelbindung angegriffen und man erhält ein Acetophenonderivat (entsprechend dem A-Ring) und einen aromatischen Aldehyd (entsprechend dem B-Ring). Diese Reaktion stellt eine Umkehrung des meistbenutzten Syntheseweges dar und wird daher auf S. 28 näher beschrieben. Führt man den Abbau mit höheren Alkalikonzentrationen (etwa 30 %) durch, so wird hauptsächlich die Carbonylgruppe angegriffen, und man erhält ein Zimtsäurederivat (entsprechend dem B-Ring) und ein Phenol (entsprechend dem A-Ring). Bei noch höheren Alkalikonzentrationen (50 % oder Kaliumhydroxydschmelze) werden sowohl die C-C Doppelbindung als auch die Carbonylgruppe angegriffen und man erhält ein Phenol (entsprechend dem A-Ring), Essigsäure und eine aromatische Säure (entsprechend dem B-Ring). Flavanone werden unter den Bedingungen des Alkaliabbaus zunächst zu Chalkonen isomerisiert (s.S. 22), die dann wie beschrieben abgebaut werden (s.Abb. 4).

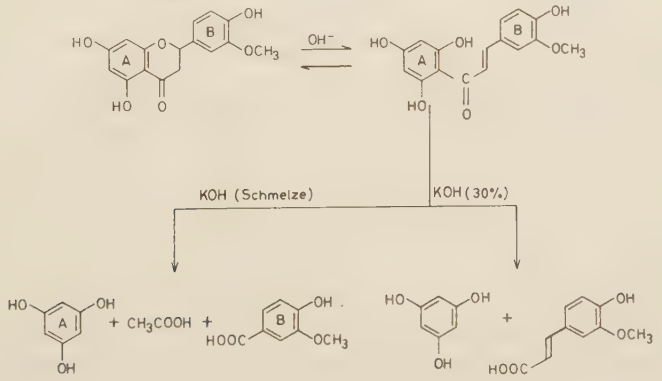


Abbildung 4

Verlauf des Alkaliabbaus bei Chalkonen und Flavanonen; dargestellt am Beispiel des Homoeriodictyols (POWER u.TUTIN,1907; n.VENKATARAMAN,1962)

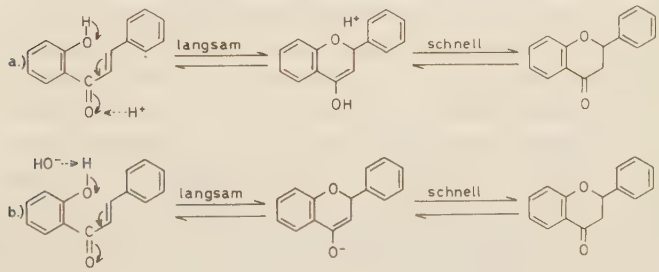
Die beim Alkaliabbau entstehenden Spaltprodukte kann man in kristalliner Form isolieren und dann mit den "klassischen" chemischen Methoden identifizieren. Dieses Verfahren wird man vor allem bei Flavonoiden anwenden, die viele oder ungewöhnliche Substituenten tragen. Die normalerweise zu erwartenden Acetophenonderivate, aromatischen Säuren oder Aldehyde, Zimtsäuren und Phenole kann man dagegen meist durch papier- oder dünnschichtchromatographischen Vergleich mit authentischen Verbindungen identifizieren. Man benötigt dazu nur sehr geringe Mengen des Gemisches aller Abbauprodukte und kann daher die Alkalispaltung im Mikromaßstab (mit 1-5 mg Substanz) durchführen.

c) Das Gleichgewicht Flavanon = Chalkon:

2'-Hydroxychalkone und die isomeren Flavanone lassen sich durch reversible Reaktionen ineinander überführen. Diese Isomerisierung wird durch Säuren und durch Basen katalysiert. In beiden Fällen ist der entscheidende Schritt der Zyklisierung ein nucleophiler Angriff des Sauerstoffatoms der 2'-Hydroxygruppe im Chalkon auf die nichtaromatische Doppelbindung (TIROUFLET u. CORVAISIER 1961; ANTEUNIS, 1960):

Der n u c l e o p h i l e Angriff ist hier möglich, da die Doppelbindung aufgrund des - M-Effekts der benachbarten Carbonylgruppe aktiviert ist, so daß das ß-Kohlenstoffatom eine positive Teilladung trägt (ANTEUNIS, 1960):

Der Angriff auf das ß-Kohlenstoffatom wird noch weiter erleichtert, wenn die Carbonylgruppe protonisiert und damit die Polarisation verstärkt wird; die Protonisierung wird dadurch im stark sauren Milieu zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Zyklisierung. Im schwach sauren, neutralen und basischen Milieu ist dagegen der nucleophile Angriff auf die C-C-Doppelbindung geschwindigkeitsbestimmend. Die Reaktionsmechanismen im sauren (a) und im basischen (b) Milieu lassen sich dann wie folgt formulieren (TIROUFLET u. CORVAISIER, 1961 u. 1962):

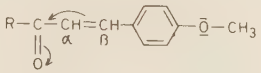


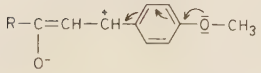
Wie schon eingangs erwähnt, ist diese Reaktion umkehrbar; es bildet sich also ein Gleichgewicht zwischen der Chalkon- und der Flavanonform aus. Die Lage dieses Gleichgewichts ist abhängig vom

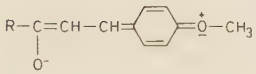
p_H des Lösungsmittels und von der Struktur der Verbindungen (z.B. der Art und der Stellung von Substituenten). Wie die Gleichgewichtslage vom p_H abhängt, ist bis jetzt noch nicht ganz geklärt: TIROUFLET u.CORVAISIER (1961) kamen auf Grund polarographischer Untersuchungen zu dem Schluß, daß die Lage des Gleichgewichts von p_H 1 - p_H 8 unverändert bleibt und sich dann mit steigendem p_H rasch zugunsten des Chalkons verschiebt, bis die Flavanonkonzentration bei p_H 13 ein Minimum (ca. 1%) erreicht. Die Autoren benutzen für diese Untersuchungen das 2'-Hydroxychalkon sowie Varianten davon, die statt des Benzolringes B verschiedene Heterocyclen enthielten. Andererseits fanden DAVID u.BOGNAR (1961) bei ihren spektrophotometrischen Untersuchungen am 2'-Hydroxychalkon eine deutliche p_H-Abhängigkeit des Gleichgewichts im Bereich von p_H6 - p_H13: Die Flavanonkonzentration im Gleichgewicht stieg zunächst rasch an und erreichte etwa bei p_H10 ein Maximum, um erst dann ebenso rasch wieder abzusinken und bei p_H13 das Minimum zu erreichen.

Die Abhängigkeit der Gleichgewichtslage von der Struktur der eingesetzten Chalkone bzw. Flavanone wurde bisher nur von TIROUFLET u.CORVAISIER (1961) systematisch untersucht. Die Autoren stellten fest, daß das Gleichgewicht umso mehr zugunsten des Chalkons verschoben wird, je elektropositiver der Substituent am ß-Kohlenstoffatom (der B-Ring) ist. Dieser Sachverhalt läßt sich folgendermaßen deuten: Der elektronenliefernde (elektropositive) Substituent delokalisiert die positive Teilladung am ß-Kohlenstoffatom stärker als z.B. ein unsubstituierter Benzolring und vermindert sie dadurch. Dieser Effekt ist also dem -M-Effekt der Carbonylgruppe entgegengerichtet; der nucleophile Angriff auf das ß-Kohlenstoffatom wird damit erschwert und so die Chalkonform stabilisiert. Diese Überlegungen gelten, wie CHOPIN, BOUILLANT u. CHADENSON (1962) experimentell belegten, auch für Chalkone, deren B-Ring kein Heterocyclus, sondern wie bei den in der Natur vorkommenden Verbindungen ein Phenylrest ist. In diesem Fall verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten des Chalkons, wenn in den Ring in p-Stellung ein elektronen-

liefernder Substituent (z.B. eine Methoxygruppe) eingeführt wird. Die gegenseitige Beeinflussung des -M-Effekts der Carbonylgruppe und des +M-Effekts eines elektropositiven Substituenten kann man folgendermaßen veranschaulichen:

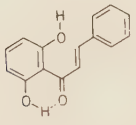






Für die Lage des Gleichgewichts sind aber nicht nur die Substituenten des B-Rings, sondern auch die des A-Rings von Bedeutung. So ist ein 2',6'-Dihydroxychalkon nur sehr schwer zu isolieren, da das Gleichgewicht im mittleren p_H-Bereich praktisch vollständig zugunsten des isomeren 5-Hydroxyflavanons verschoben ist (vergl. SHIMOKORIYAMA 1957). Diese auffällige Stabilität der Flavanonform ist nach NARASIMHACHARI u.SESHADRI (1948) auf eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 5-Hydroxygruppe und der Carbonylgruppe zurückzuführen; man kann das folgendermaßen veranschaulichen (DEAN 1963):

Ein 2',6'-Dihydroxychalkon bevorzugt durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen einer der Hydroxygruppen und der Carbonylgruppe eine Konfiguration, in der sich die olefinische Doppelbindung in einer zum Ringschluß mit der anderen Hydroxygruppe günstigen Lage befindet:



Dadurch wird die Reaktionsgeschwindigkeit der Zyklisierung so wesentlich erhöht, daß die rückläufige Reaktion, d.h. die Ringöffnung, kaum ins Gewicht fällt.

Auch eine 6-Hydroxygruppe im Flavanon erhöht dessen Widerstandsfähigkeit gegen eine Ringöffnung (zit.n. DEAN 1963).

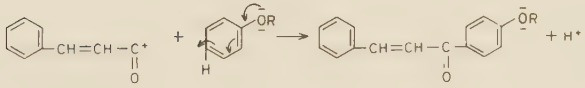
Dagegen lassen sich 8-Hydroxyflavanone nur schwer durch Zyklisierung der entsprechenden Chalkone darstellen. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf sterische Hinderung zurückzuführen (DEAN 1963).

d) Synthese von Chalkonen:

Es sind im wesentlichen zwei Methoden zur Synthese von Chalkonen bzw. Flavanonen bekannt:

1.) Die FRIEDEL-CRAFTS Acylierung von Phenylalkylaethern oder freien Phenolen mit substituierten Zimtsäurechloriden in Gegenwart von Aluminiumchlorid als Katalysator. Diese Reaktion, die zuerst von BEHN u.SIMONIS (zit.n.DEAN, 1963) benutzt und dann von ROSENMUND u.ROSENMUND (1928) sowie von SHINODA u.SATO (1928) in die Flavanonchemie eingeführt wurden, liefert im allgemeinen Chalkone als Reaktionsprodukte; nur wenn als Phenol Phloroglucin eingesetzt wird, bilden sich direkt die entsprechenden Flavanone (vergl.S.25). Der Mechanismus dieser Reaktion läßt sich analog anderen FRIEDEL-CRAFTS Acylierungen folgendermaßen formulieren (vergl. SYKES, 1964):

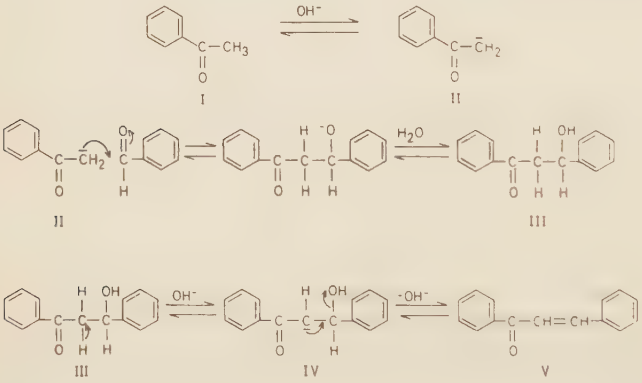
I



I II III

Das Aluminiumchlorid reagiert demnach mit dem Säurechlorid unter Bildung eines Acyliumions (I) und eines komplexen Tetrachloroaluminations. Das Acyliumion reagiert dann als elektrophiles Agens mit dem Phenol oder Phenolaether (II) unter Bildung eines Chalkons (III).

2.) Die Kondensation von substituierten Acetophenonen mit substituierten Benzaldehyden im alkalischen Milieu (CLAISEN-SCHMIDT Kondensation). Diese Reaktion liefert ebenfalls meist das entsprechende Chalkon als Hauptprodukt; sie verläuft wahrscheinlich nach Art einer Aldoladdition mit anschließender Wasserabspaltung (FIESER u. FIESER, 1957). Der Reaktionsmechanismus läßt sich folgendermaßen formulieren (vergl. SYKES, 1964):



Die aktivierte Methylgruppe des Acetophenons (I) reagiert mit der Base unter Bildung eines Carbanions (II), das dann die

Carbonylgruppe des aromatischen Aldehyds angreift, wobei nach Aufnahme eines Protons aus dem Lösungsmittel das Aldol (III) entsteht. Die CH_2-Gruppe im Aldol ist durch die benachbarte Carbonylgruppe aktiviert und kann daher ein Carbanion (IV) bilden, das sich dann stabilisiert, indem es die Hydroxygruppe am ß-Kohlenstoffatom als Anion abspaltet. Durch diese basenkatalysierte Wasserabspaltung bildet sich dann das Chalkon (V).

Manche Acetophenone (z.B. das Phloracetophenon) sind zu reaktionsträge für diese basenkatalysierte Kondensation (SONN u. BÜLOW, 1925); in diesem Fall ist die Verwendung von Chlorwasserstoff in Aethylacetat vorzuziehen (RUSSEL u. TODD, 1934 u. 1937; zit.n. DEAN 1963).

V Eigene Untersuchungen:

H A U P T T E I L

A) Die Flavone von Vitex agnus castus L.

1.) Verbindung F_3

a) Isolierung aus den Früchten von Vitex agnus castus:

Die Verbindung F_3 war bereits von SIRAIT (1961) aus den Blättern von Vitex agnus castus isoliert worden. In Vorversuchen stellte ich jedoch fest, daß sie sich aus den Früchten der gleichen Art wesentlich schneller und einfacher gewinnen ließ: Man extrahiert die gemahlenen Früchte im Soxhlet-Apparat mit Petrolaether und schon nach kurzer Zeit beginnt sich die Substanz in der Vorlage auszuscheiden. Das in den Früchten reichlich vorhandene Fett wirkt dabei offenbar als Lösungsvermittler; denn die reine Verbindung F_3 ist in Petrolaether praktisch unlöslich. Nach dem Umkristallisieren des Rohproduktes aus Aethanol erhält man derbe gelbe Prismen vom Schmelzpunkt 188-189°. Die Ausbeute beträgt etwa 15 mg% bezogen auf lufttrockene Droge.

b) Identifizierung als 3',5-Dihydroxy-3,4',6,7-tetramethoxyflavon:

Auf Grund seiner Untersuchungen (die wichtigsten Ergebnisse sind in Tab.1 zusammengestellt) charakterisierte SIRAIT (1961) die Verbindung F_3 als ein Flavon-Aglykon mit 2 freien Hydroxygruppen.

Summenformel:	$C_{19}H_{18}O_8$
UV-Spektrum:	λ_{max}: 258, 350 nm
	ε_{max}: 20600, 22200 $1\ Mol^{-1}cm^{-1}$
Spaltprodukt bei Alkaliabbau:	Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure)
Acetylderivat:	$C_{19}H_{16}O_8 \cdot (CH_3CO)_2$

Tabelle 1

Eigenschaften der Verbindung F_3 (SIRAIT, 1961)

Die weitere Untersuchung zeigte, daß die Verbindung außerdem 4 Methoxygruppen enthält; F_3 ist demnach ein Dihydroxy-tetramethoxy-flavon, was mit der Bruttoformel gut übereinstimmt. Die Stellung der Hydroxy- und Methoxygruppen ergab sich aus folgenden Versuchen: Bei der Entmethylierung von F_3 entsteht ein Produkt (F_3E), dessen Schmelzpunkt und UV-Spektrum mit den von BRIGGS u. LOCKER (1951) angegebenen Daten für Quercetagetin (3,3',4',5,6,7-Hexahydroxy-flavon) übereinstimmt (s.Tab. 2)

Verbindung	Schmp.	UV-Spektrum
F_3E	310° (Zers.)	λ_{max} : 259, 272 (Inflex.), 361 nm $lg\varepsilon_{max}$: 4,24; 4,15 ; 4,34
Quercetagetin	316° +) (Zers.)	λ_{max} ++): 259, 272 (Inflex.), 361 nm $lg\varepsilon_{max}$ ++): 4,23; 4,15 ; 4,34

+) Daten nach BAKER, NODZU u. ROBINSON (1929)

++) Daten nach BRIGGS u. LOCKER (1951)

Tabelle 2

Vergleich des Entmethylierungsproduktes von F_3 (F_3E) mit Quercetagetin (3,3',4',5,6,7-Hexahydroxyflavon).

Damit ist die Stellung der Sauerstoffunktionen festgelegt; zu klären war nun noch die Stellung der beiden freien Hydroxygruppen. Es gelang durch Verwendung von Diazomethan eine der Hydroxygruppen selektiv zu methylieren. Die verbliebene nichtmethylierte Hydroxy-gruppe ließ sich nun einwandfrei lokalisieren: das Reaktionsprodukt (F_3Me) gab eine positive Reaktion mit Eisen-III-Chlorid in aethanolischer Lösung und Schmelzpunkt sowie UV-Spektrum stimmten mit den Literaturangaben für Artemetin (5-Hydroxy-3,3',4',6,7-pentamethoxy-flavon überein [s.Tab. 3]). Diese Hydroxygruppe mußte sich also in Stellung 5 befinden.

Verbindung	Schmp.	UV-Spektrum
F_3Me	158-159°	λ_{max} : 256, 273, 348 nm $lg\varepsilon_{max}$: 4,24, 4,20, 4,35 +++)
Artemetin	158-159° +) 160-161,5° ++)	λ_{max} +) : 256, 273, 348 nm $lg\varepsilon_{max}$ +) : 4,38; 4,33; 4,48 +++)

+) Daten nach HERZ (1961)

++) Daten nach ČEKAN u. HEROUT (1956)

+++) Wegen der Differenzen in den $lg\varepsilon_{max}$-Werten s.S. 58

Tabelle 3

Vergleich des Methylierungsproduktes von F_3 (F_3Me) mit Artemetin (5-Hydroxy-3,3',4',6,7-pentamethoxyflavon).

Um die Stellung der zweiten freien Hydroxygruppe festzulegen, wurde nochmals ein Alkaliabbau durchgeführt. SIRAIT (1961) hatte zwar schon Protocatechusäure als Spaltprodukt nachgewiesen, doch war das Vorliegen einer o-Dihydroxygruppierung im B-Ring auf Grund der UV-Spektren (SIRAIT) und auf Grund meiner bisherigen Untersuchungen sehr unwahrscheinlich. Man mußte daher damit rechnen, daß unter den drastischen Bedingungen, die SIRAIT anwandte (Kaliumhydroxydschmelze bei 210°), eine Entmethylierung stattfindet (vergl. z.B. VENKATARAMAN, 1962). Ich führte daher den Alkaliabbau unter möglichst schonenden Bedingungen (siedende aethanolische Kalilauge) durch. Tatsächlich konnte nun unter den Spaltprodukten eine methylierte Phenolcarbonsäure, die Isovanillinsäure (3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure), nachgewiesen und chromatographisch einwandfrei identifiziert werden. Die zweite freie Hydroxygruppe mußte sich also in Stellung 3' befinden. Damit war die Struktur der Verbindung F_3 geklärt: es handelt sich um das 3',5-Dihydroxy-3,4',6,7-tetramethoxyflavon (s.Abb. 5). Wir kommen damit zu dem gleichen Ergeb-

nis wie kurz vor uns BELIČ, BERGANT-DOLAR u. MORTON (1961), von deren Arbeit wir jedoch erst während dieser Untersuchungen Kenntnis erhielten. Die genannten Autoren hatten die Verbindung F_3, für die sie den Namen Casticin vorschlagen, ebenfalls aus den Früchten von Vitex agnus castus isoliert.

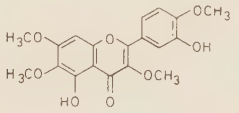


Abbildung 5

Casticin (BELIČ, BERGANT-DOLAR u. MORTON, 1961)

2.) Verbindung F_1

a) Isolierung aus den Blättern von Vitex agnus castus:

Die Extraktion des Pflanzenmaterials und die Aufarbeitung des Extraktes erfolgte zunächst in der für die Gewinnung von Flavonglykosiden üblichen Weise (vergl. z.B. GEISSMAN 1955 und TRIM 1955): Zur Entfernung fett- und wachsartiger Ballaststoffe sowie anderer lipoidlöslicher Inhaltsstoffe (z.B. F_3), wurde die Droge mit Methylenchlorid vorextrahiert. Die Extraktion des gewünschten Glykosides erfolgte dann mit Methanol. Derartige Extrakte enthalten gewöhnlich noch größere Mengen von Chlorophyll sowie Kohlehydrate, die vor der weiteren Aufarbeitung entfernt werden müssen, da sie die Abscheidung und Kristallisation der gesuchten Substanzen sehr stören. In dem Methanolextrakt der Vitex-Blätter sind außerdem noch zwei Pseudoindikan-Glykoside (Aucubin und Agnusid; WINDE u. HÄNSEL 1960) vorhanden, die ebenfalls die Abscheidung der Flavonglykoside verhindern (SIRAIT 1961). Der Methanolextrakt wurde daher im Vakuum bis zur zähflüssigen Konsistenz eingeengt

und der Rückstand mit heißem Wasser extrahiert; dabei gehen u.a. die Flavonglykoside, Pseudoindikane und Kohlehydrate in Lösung, während das Chlorophyll und etwa noch vorhandene Fette und Wachse ungelöst bleiben und sich durch Zentrifugieren entfernen lassen. Die klare wäßrige Lösung wurde dann mit Butanol ausgeschüttelt; dabei werden Flavonoide und Pseudoindikane in die organische Phase überführt, während ein großer Teil der Kohlehydrate und andere Verunreinigungen in der wäßrigen Phase zurückbleiben. Die Entfernung der Pseudoindikane gelang schließlich durch kurze Säurehydrolyse und anschließende Abtrennung des polymerisierten Aglykons durch Filtration. Während dieser Behandlung bleiben die Flavonglykoside unverändert, wie eine papierchromatographische Prüfung ergab. - Der nun schon weitgehend gereinigte Extrakt enthält neben dem gesuchten F_1 ein weiteres Flavonglykosid (F_2 = Luteolin-7-glucosid; SIRAIT 1961), zwei Phenolcarbonsäuren (SIRAIT 1961), sowie einige nicht näher untersuchte Stoffe ähnlicher Polarität. Für die Auftrennung dieses Stoffgemisches erwies sich die Säulenchromatographie an Polyamid als sehr geeignet. Nach zweimaliger Trennung an diesem Sorptionsmittel konnte die Verbindung F_1 rein erhalten werden. Sie kristallisiert aus Aethanol/Wasser in Form gelber igelförmiger Kristallaggregate vom Schmelzpunkt 238-239°. Die Ausbeute betrug 7 mg%, bezogen auf lufttrockene Droge.

b) Identifizierung als Homo-Orientin:

Der positive Ausfall der Reduktionsprobe nach SHINODA (1928) und das UV-Spektrum (λ_{max}: 259, 270, 351 nm; ε_{max}: 38,6; 40,4; 47,9) weisen die Verbindung F_1 als Flavon aus (SIRAIT 1961). Aus der Art der Verschiebung der UV-Absorptionsbanden beim Zusatz basischer und komplexbildender Reagenzien sowie aus verschiedenen Farbreaktionen geht hervor, daß die Verbindung je eine freie Hydroxygruppe in 5- und 7-Stellung sowie eine o-Dihydroxygruppierung im B-Ring enthält (SIRAIT 1961). Die Stellung der Substituenten im B-Ring ließ sich durch Alkaliabbau festlegen: Von den bei dieser Reaktion entstehenden Spaltprodukten konnte SIRAIT (1961) eines als Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure) identifizieren. Demnach

befinden sich die beiden Hydroxygruppen in den Stellungen 3' und 4'. Die Verbindung F_1 sollte also ein Derivat des Luteolins (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavons) sein. Dafür spricht auch das UV-Spektrum (s.o.): es ist dem des Luteolins (λ_{max}: 258, 355 nm) hinsichtlich der Lage der Maxima sehr ähnlich. Die spezifischen Extinktionskoeffizienten unterscheiden sich allerdings beträchtlich: z.B. Luteolin, $\mathcal{E}'_{258}$ = 57,9; F_1, $\mathcal{E}'_{259}$= 38,6. Das bedeutet, daß die Verbindung F_1 ein erheblich höheres Molekulargewicht besitzen muß als das Aglykon Luteolin. Auch die Bruttoformel ($C_{22}H_{24}O_{12}$ n.SIRAIT oder $C_{21}H_{20}O_{11}$) und die Hydrophilität von F_1 (Rf 0,39 im System Aethylacetat/Ameisensäure/Wasser, 10:2:3) sprechen gegen das Vorliegen eines Aglykons; diese Daten lassen vielmehr vermuten, daß es sich um ein O- oder um ein C-Glykosid handelt. Die erste Möglichkeit (O-Glykosid) konnte bald ausgeschlossen werden: Alle Versuche, die Verbindung mit Säuren (1n Salzsäure, KILIANI-Mischung) oder Enzympräparaten (ß-Glucosidase, Emulsin, Hydrolasengemisch) zu hydrolysieren, schlugen fehl: Die Enzyme bewirkten keine Veränderung und nach der Säurehydrolyse konnte weder ein Zucker (papierchromatographisch[+]) und als Osazon[++]) noch eine Verbindung, deren Polarität auf ein Aglykon schließen läßt, nachgewiesen werden.

Das Vorliegen eines C-Glykosides wurde auf folgendem Wege bewiesen: Unter den Bedingungen der Säurehydrolyse (1n Salzsäure) wird die Verbindung F_1 (Rf 0,39, Aethylacetat/Ameisensäure/Wasser, 10:2:3) teilweise in eine zweite Verbindung (=F_i) von ähnlicher Polarität (Rf 0,32, Aethylacetat/Ameisensäure/Wasser, 10:2:3) umgewandelt. Diese Umwandlung gelingt auch bei langer Säureeinwirkung nicht quantitativ, d.h. in der Reaktionslösung läßt sich neben dem Umwandlunsprodukt F_i immer noch eine beträchtliche Menge des Aus-

---

+) Der von SIRAIT (1961) beschriebene papierchromatographische Nachweis von Glucose konnte nicht reproduziert werden.

++) SIRAIT (1961)

gangsproduktes F_1 nachweisen. Es scheint sich demnach um eine Gleichgewichtsreaktion zu handeln. Stimmt diese Annahme, so muß die Reaktion reversibel sein, das Gleichgewicht muß sich also auch von der anderen Seite her einstellen lassen. Das gelingt auch tatsächlich: Wird das F_i nach der Säurebehandlung durch Verteilungschromatographie an Cellulosesäulen von F_1 abgetrennt und dann mit 1 n Salzsäure behandelt, so lassen sich in der Reaktionslösung wieder beide Verbindungen, F_i und F_1, nachweisen. Für C-Glykoside der Flavonreihe sind nun bereits mehrfach säurekatalysierte Isomerisierungen+) beschrieben worden (SEIKEL u. GEISSMAN 1957; BRIGGS u. CAMBIE 1958; HÖRHAMMER u.Mitarb. 1959; SEIKEL u. BUSHNELL 1959), die unter den gleichen Bedingungen stattfinden, ebenfalls reversibel sind und für diese Stoffgruppe charakteristisch zu sein scheinen. Die Wahrscheinlichkeit, daß es sich beim F_1 um ein C-Glykosid handelt,war daher sehr groß. Der endgültige Beweis wurde durch reduktive Spaltung der C-glykosidischen Bindung mit Jodwasserstoffsäure in Phenol nach RAMANATHAN u. SESHADRI (1960) erbracht. Bei dieser Reaktion wird formal der Glykosylrest durch ein Wasserstoffatom ersetzt; aus der Verbindung F_1 entstand wie erwartet das "Aglykon" Luteolin, das durch Cochromatographie mit authentischem Luteolin in 5 verschiedenen Laufmitteln identifiziert wurde (s.Tab. 4 S. 39).

Die Verbindung F_1 ist also ein C-Glykosid des Luteolins und konnte daher mit einem der bereits bekannten isomeren Luteolin-C-glykoside Orientin oder Homo-Orientin (HÖRHAMMER u. Mitarb. 1959; SEIKEL u. BUSHNELL, 1959; KOEPPEN, SMIT u. ROUX 1962; KOEPPEN, 1964; KOEPPEN u. ROUX, 1964) identisch sein. Da uns zunächst nur

---

+) Nach KOEPPEN u. ROUX (1964) sowie HOROWITZ u. GENTILI (1964) handelt es sich um Ring-Isomerisierungen; die Isomeren unterscheiden sich also durch die Stellung des Glykosylrestes im Ring A des Flavonmoleküls (6- bzw. 8-Stellung).

authentisches Orientin[+)] zur Verfügung stand[++)], verglichen wir diese Verbindung papierchromatographisch sowohl mit F_1 als auch mit dem Isomerisierungsprodukt F_i. Es zeigte sich, daß das F_i mit Orientin identisch ist; demnach sollte es sich beim F_1 um Homo-Orientin (s.Abb.) handeln. Tatsächlich stimmten auch alle chemischen und physikalischen Eigenschaften unserer Verbindung F_1 mit den Daten überein, die KOEPPEN, SMIT u. ROUX (1962) für ihr aus A s p a l a t h u s a c u m i n a t u s isoliertes Homo-Orientin angeben. Der endgültige Beweis für die Identität beider Substanzen konnte durch Cochromatographie in 5 verschiedenen Laufmitteln, Misch-Schmelzpunkt und Vergleich der IR-Spektren erbracht werden[+++)] (s.Tab. 4).

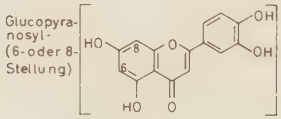


Abbildung 6
Homo-Orientin (= F_1)
(KOEPPEN u.ROUX, 1964)

+) Wir danken Herrn Dr. M. SHIMOKORIYAMA, Tokio, für die Überlassung einer Probe Orientin aus Oxalis cernua.

++) HÖRHAMMER u. Mitarb. sowie SEIKEL u. BUSHNELL hatten das Homo-Orientin nur papierchromatographisch nachweisen können; die Isolierung gelang 1962 KOEPPEN, SMIT u. ROUX, von deren Arbeit wir jedoch erst nach Durchführung dieser Vergleiche Kenntnis erhielten.

+++) Wir danken Herrn Dr. B.H. KOEPPEN, Stellenbosch Südafrikanische Union, für die Überlassung einer Probe Homo-Orientin aus Aspalathus acuminatus.

		F_1	Homo-Orientin
Schmelzpunkt		238-239°	237-239°
Misch-Schmelzpunkt		237-239°	
IR-Spektrum		Die Spektren sind identisch im Bereich von 4000-700 cm^{-1} (s.S.)	
Rf-Wert im System (Papierchromatographie)	I	0,33	0,33
	II	0,56	0,56
	III	0,61	0,61
	IV	0,39	0,39
	V	0,73	0,73

I = Essigsäure/Wasser, 15:85
II = Essigsäure/Wasser, 3:7
III = Butanol/Essigsäure (27%ig), 1:1
IV = Aethylacetat/Ameisensäure/Wasser, 10:2:3
v = Essigsäure/Wasser/Salzsäure (25%ig), 30:10:3

Tabelle 4

Vergleich der Verbindung F_1 mit authentischem Homo-Orientin

B) Zwei neue Chalkonglykoside aus Helichrysum bracteatum (VENT.) WILLD.:

1.) Isolierung der Verbindungen A und B aus den Hüllblättern einer gelben Sorte von Helichrysum bracteatum (VENT.)WILLD.

Die Hüllblätter der gelben Sorte von Helichrysum bracteatum wurden als Ausgangsmaterial für die Isolierung gewählt, da die Chalkonglykoside hier in relativ hohen Konzentrationen vorkommen und nicht wie etwa in der braunen Sorte von Anthocyanen begleitet werden.

Die Droge enthält nur wenige störende Ballaststoffe (kaum Chlorophyll, wenig Lipoide und petrolaetherlösliche Farbstoffe), die sich durch Vorextraktion mit Petrolaether leicht entfernen

lassen. Das Hauptproblem der Isolierung liegt in der Auftrennung des Acetonextraktes, der neben den beiden Chalkonglykosiden noch eine ganze Reihe nahe verwandter Flavonoide enthält (1 Auronglykosid, 3 Flavonglykoside, 1 Flavonaglykon, n. FRENZEL, 1963). Für die Trennung derartiger komplexer Gemische ähnlicher Stoffe kommen in erster Linie chromatographische Methoden in Frage. Bei der Anwendung dieser Methoden treten jedoch, abgesehen von den Schwierigkeiten, genügend trennscharfe Systeme für diese sehr hydrophilen Verbindungen zu finden, noch folgende Komplikationen auf: Einerseits muß das Gemisch soweit aufgetrennt werden, daß die Chalkonglykoside in sehr reiner Form vorliegen; denn sonst kann man sie selbst aus konzentrierten Lösungen nicht ausfällen, geschweige denn kristallisieren. Andererseits sinkt mit jeder Säulentrennung die Ausbeute ganz erheblich, da die Chalkone vor allem in adsorbiertem Zustand sehr empfindlich gegenüber Luftsauerstoff sind und sich schnell zersetzen. Das gilt ganz besonders für die Verbindung B. Man müßte also entweder alle chromatographischen Trennungen unter Stickstoff durchführen, was sehr aufwendig ist, oder aber man kann versuchen, die bei Luftzutritt unvermeidlichen Verluste durch sehr rasches Arbeiten und wenige, möglichst selektive Trennungen klein zu halten. Ich entschied mich für die zweite Möglichkeit.

Die Droge wurde also zunächst mit Petrolaether vorextrahiert. Dann wurde sie im Soxhlet-Apparat unter möglichst schonenden Bedingungen (Zusatz von Calciumcarbonat zur Neutralisation von Pflanzensäuren, Wechsel der Vorlage alle 2 Stunden) mit Aceton ausgezogen. Der Acetonextrakt wurde jeweils sofort im Vakuum zur Trockne eingeengt; dieser Trockenextrakt war dann im Exsiccator einige Tage haltbar. Er wurde zunächst zweimal an Polyamidsäulen chromatographiert: Beim ersten Mal gelang die Abtrennung der Flavone und anderer nicht identifizierter Verbindungen von den Anthochloren (den Chalkonglykosiden A und B und dem schon bekannten (HÄNSEL u. LANGHAMMER, 1963) Bractein . Beim zweiten Mal konnten die Anthochlore in zwei Fraktionen aufgetrennt werden:

Die eine (Fraktion 1') enthielt die Verbindung A und Bractein, die andere (Fraktion 2') enthielt die Verbindung B und Bractein. Die Abtrennung des Bracteins von den Chalkonglykosiden gelang schließlich durch Verteilungschromatographie an Cellulosesäulen.+) Auf diese Weise erhielt ich 250 mg (ca. 4 mg%) der Verbindung A vom Schmelzpunkt 165-166° und 18 mg (ca. 0,3 mg%) der Verbindung B vom Schmelzpunkt 175-177°.

Der Trennungsgang ist nochmals auf S. 42 schematisch dargestellt.

+) Für diese Trennung wurde ein neues Lösungsmittelsystem entwickelt, das sowohl für die Verteilungschromatographie als auch für die CRAIG-Verteilung hydrophiler Flavonoide geeignet ist. Es besteht aus den Komponenten Aethylmethylketon/Benzol/Wasser. Für die CRAIG-Verteilung muß das Benzol zum Teil oder ganz durch Hexan ersetzt werden, um eine bessere Phasentrennung zu erreichen. Außerdem kann das Keton durch Butanol ersetzt werden; das System eignet sich dann z.B. zur Trennung der isomeren Flavon-C-Glykoside Orientin und Homo-Orientin (s.S.63).

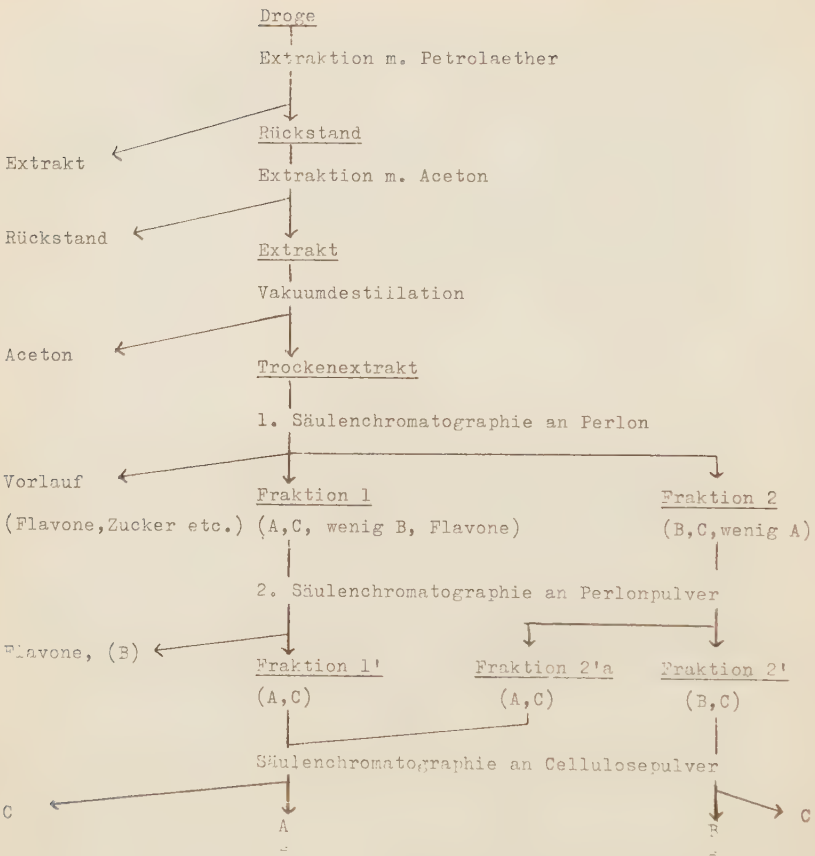


Abbildung 7

Schematische Darstellung des Trennungsganges bei der Isolierung der Verbindungen A und B aus den Hüllblättern einer gelben Sorte von Helichrysum bracteatum (VENT.) Willd.

2.) Gewinnung des Aglykons F_B:

Bei der ersten Isolierung waren insgesamt nur 18 mg der Verbindung B angefallen. Um das Aglykon zu gewinnen, mußte also auf jeden Fall noch einmal isoliert werden. Die Isolierung der reinen Verbindung B hatte sich als sehr mühsam und verlustreich erwiesen. Das Aglykon F_B sollte sich dagegen schneller und mit besserer Ausbeute isolieren lassen; denn als Flavanon wandert es an Polyamidsäulen schon mit 50 - 70%igem Methanol sehr rasch (NEU 1960) und läßt sich so von fast allen Begleitstoffen abtrennen. Zudem besitzt es eine wesentlich größere Kristallisationstendenz als das Glykosid. Ich ging daher folgendermaßen vor: Der Acetonextrakt der Hüllblätter wurde wie bei der Isolierung der Glykoside durch zweimalige Säulenchromatographie an Polyamid aufgetrennt. Dann aber wurde die Fraktion 2' (s.Tab. 7 S.42), die die Verbindungen B und C aber kein A mehr enthielt, kurze Zeit mit Säure erhitzt. Aus dem Hydrolysat konnte dann das Aglykon F_B durch nochmalige Säulenchromatographie an Polyamid abgetrennt werden. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 93 mg% bezogen auf lufttrockene Droge. Die reine Verbindung schmilzt bei 253-256°.

3.) Identifizierung der Verbindung A

a) Charakterisierung durch analytische Methoden:

Die Verbindung A zeigt auf dem Dünnschichtchromatogramm im Tageslicht einen kräftig gelben Fleck, der im langwelligen UV-Licht unbehandelt braun, nach Bedampfen mit Ammoniak dagegen kräftig rot erscheint. Nach kurzer Säurehydrolyse einer A-haltigen Lösung ist dünnschichtchromatographisch kein Fleck mit einem derartigen Farbverhalten mehr nachweisbar; stattdessen findet sich im Papierchromatogramm des Hydrolysats ein im kurzwelligen UV-Licht sichtbarer Fleck, der im System Butanol/Eisessig/Wasser einen erheblich höheren Rf-Wert aufweist als die Verbindung A und der nach dem Besprühen mit Natriumborhydrid und anschließender Säurebehandlung eine im Tageslicht kräftig rotviolette Farbe annimmt. Die Befunde sprechen für das Vorliegen eines Chalkonglykosides, das sich

während der Säurehydrolyse in das korrespondierende Flavanon-Aglykon umwandelt. (FRENZEL, 1963).

Diese Deutung ließ sich durch Untersuchungen an der reinen, kristallinen Substanz vollauf bestätigen:

1.) Das UV-Spektrum der vollacetylierten Verbindung A (= A Ac) weist nur ein Maximum auf, dessen Lage (λ_{max}= 300 nm) und Intensität (ε_{max}=21400) charakteristisch für ein Polyacetoxychalkon ist (vergl. GEISSMAN, 1955).

2.) Hydrolysiert man die kräftig gelb gefärbte Verbindung A mit 1n Schwefelsäure, so entsteht neben Glucose, die papierchromatographisch und als Osazon nachgewiesen wurde, eine farblose kristallisierbare Substanz (=F_A). Die Flavanonstruktur dieser Verbindung ergab sich einmal aus dem charakteristischen Ausfall der Reduktionsproben - Violettfärbung mit Magnesium und Salzsäure nach SHINODA (1928); Rotviolettfärbung mit Natriumborhydrid und Salzsäure nach EIGEN u.Mitarb. (1957) - zum anderen aus dem UV-Spektrum der vollacetylierten Verbindung (=F_AAc): Das Spektrum hat große Ähnlichkeit mit den Spektren anderer Polyacetoxyflavanone, z.B. dem des Naringenin-Triacetats (s.S.72).

Auf Grund der Elementaranalyse und der Acetylbestimmung von F_AAc kommt der Verbindung F_A die Struktur eines Tetrahydroxyflavanons zu. Die Anordnung der Hydroxygruppen ergab sich aus der Alkalispaltung von F_A: Als Reaktionsprodukte konnten papierchromatographisch Phloroglucin und Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) nachgewiesen werden. F_A ist demnach identisch mit dem 3',4',5,7-Tetrahydroxyflavanon, das unter dem Namen Eriodictyol bereits in der Literatur beschrieben ist. Tatsächlich stimmen auch die Schmelzpunkte von F_A und F_AAc gut mit den Literaturschmelzpunkten für Eriodictyol und Eriodictyol-Tetraacetat überein (s.S.71).

Die Stellung des Zuckerrestes ergab sich aus dem Verhalten des Glykosides bei der Hydrolyse: Chalkonglykoside liefern bei der Hydrolyse mit verdünnten Säuren im allgemeinen ein Gemisch der Chalkon- und Flavanonform des Aglykons, wobei je nach Erhitzungs-

dauer, sowie Art, Zahl und Stellung der Substituenten die eine oder die andere Form überwiegt (vergl.S.24). Die Verbindung A lieferte aber schon bei kurzer Säurehydrolyse fast nur die Flavanonform und lediglich Spuren der Chalkonform des Aglykons. Eine derartig rasche Einstellung und einseitige Lage des Gleichgewichts Chalkon = Flavanon im schwach sauren Milieu ist nur für Chalkone mit freien 2' und 6'-Hydroxygruppen bekannt; man schreibt die in diesem Falle stark erhöhte Stabilität der Flavanonform der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxygruppe in 5-Stellung und der Carbonylgruppe in 4-Stellung des Flavanons zu (NARASIMHACHARI u. SESHADRI, 1948). Da die Chalkone dieses Typs im physiologischen p_H-Bereich also nicht stabil sind, wurden sie bisher auch noch nicht in der Natur aufgefunden; es war also nicht anzunehmen, daß die Verbindung A in der 2'- und 6'-Stellung freie Hydroxygruppen trägt; dagegen ist es sehr wahrscheinlich, daß die eine der beiden Stellungen mit einer Glykosyloxy- und die andere mit einer Hydroxygruppe besetzt ist (FRENZEL, 1963). Derartige Glykoside sind auch in vivo in der Chalkonform stabil (z.B. Isosalipurposid) und liefern bei der Säurehydrolyse praktisch nur die Flavanonform des Aglykons.

Um die Struktur zu beweisen, die sich aus den analytischen Daten ergibt, wurde das 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxychalkon synthetisiert und mit der natürlichen Verbindung verglichen.

b) Synthese des 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxychalkons und Vergleich mit der natürlichen Verbindung A:

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von ZEMPLEN u.BOGNAR (1942) durch "kalte" alkalische Kondensation (vergl.S.28) von 2-ß-D - Glucosidophloracetophenon (2ßD-Glucosyloxy-4,6-Dihydroxyacetophenon), =V, mit Protocatechualdehyd (3,4-Dihydroxybenzaldehyd), =VI; die Reaktion wurde - wegen der Oxydationsempfindlichkeit des Aldehydes im alkalischen Milieu - unter Stickstoff ausgeführt. Das Ketonglucosid wurde auf folgendem Wege dargestellt (ZEMPLEN u.BOGNAR, 1942): Phloracetophenon (2,4,6-Trihydroxyacetophenon), =I, wurde selektiv in 4-Stellung

I = Phloracetophenon

II = 4-Benzoylphlor-acetophenon

III= Acetobromglucose

IV = 2-(Tetraacetyl-D-glucosido)-4-benzoyl-phloracetophenon

V = 2-D-Glucosido-phloracetophenon

VI = Protocatechualdehyd

VII= Gallusaldehyd

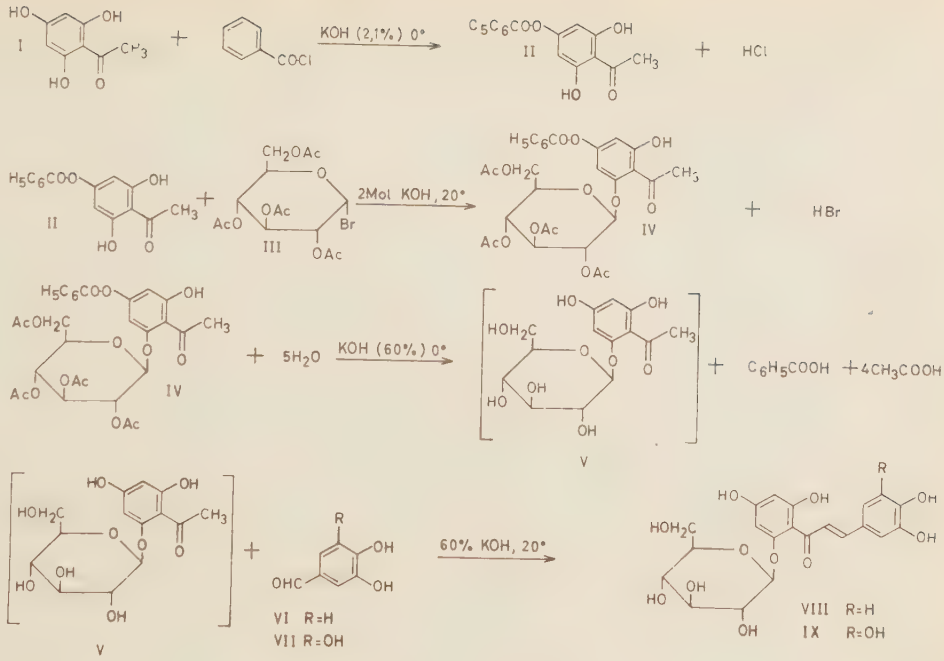
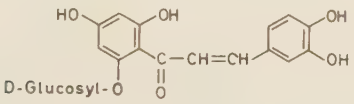


Abbildung 8

Synthese des 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxychalkons (VIII) und des 2'-Glucosyloxy-3,4,4',5,6'-pentahydroxychalkons (IX).

benzoyliert (CANTER, CURD u. ROBERTSON, 1931); bei der anschließenden Umsetzung des 4-Benzoylphloracetophenons (=II) mit Acetobromglucose (=III) kann dann der Tetraacetylglucosylrest nur noch mit einer der beiden gleichwertigen Hydroxygruppen in 2- oder 6-Stellung reagieren, es entsteht das 2ßD-Tetraacetylglucosyloxy-4-benzoyloxy-6-hydroxyacetophenon (=IV). Nach hydrolytischer Abspaltung der Acetyl- und Benzoylgruppen erhält man dann das 2ßD-Glucosidophloracetophenon, das gleich darauf - ohne es erst zu isolieren - mit dem Aldehyd kondensiert wird. Die gesamte Reaktionsfolge ist auf S.46 in Formeln dargestellt.

Das Syntheseprodukt stimmte in allen geprüften Eigenschaften (s.Tab. 5) mit der natürlichen Verbindung A überein. Damit war die Konstitution von A endgültig bewiesen:



Verbindung A
(2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxychalkon)
Abb. 9

Diese Verbindung ist unseres Wissens bisher weder aus pflanzlichem Material isoliert noch synthetisch dargestellt worden.

4. Identifizierung der Verbindung B.

a) Charakterisierung durch analytische Methoden:

FRENZEL (1963) hatte bereits festgestellt, daß es sich bei der Verbindung B um ein Chalkonglykosid handelt. Ferner konnte er zeigen, daß bei der Säurehydrolyse von B ebenso wie bei der Hydrolyse von A ein Flavanon-Aglykon entsteht. Aus den auf S.45 erläuterten Gründen ist also anzunehmen, daß auch die Verbindung B

	A nat.	A synth.
Schmelzpunkt	165 - 166°	165 - 166°
Misch-Schmelzpunkt	164 - 166°	
Eutektikum mit Phenacetin	113°	113°
Eutektikum mit Benzanilid	148°	148°
UV-Spektrum	λ_{max}: 209, 248, 261, 325*), 383 nm	λ_{max}: 209, 248, 261, 32 383 nm
*) Inflexion	ε_{max}: 36600, 6780, 6370, 12500, 30300	ε_{max}: 36600, 6810, 636 12500, 30300
	$lg\varepsilon_{max}$: 4,56; 3,83; 3,80; 4,10; 4,48	$lg\varepsilon_{max}$: 4,56; 3,83; 3,80 4,10; 4,48
	Der Kurvenverlauf ist identisch im Bereich von 210 - 440 nm	
IR-Spektrum	$\tilde{\nu}_{max}$= 3333 s, 2941 m, 2326 w, 1600 s, 1550 s, 1504 s, 1449s, 1351 s, 1290 s, 1258 s, 1205s, 1170 s, 1117 s, 1081 s, 1036s, 1000 m, 980 m, 902 w, 862m, 826 m, 771 m cm^{-1}	$\tilde{\nu}_{max}$= 3333 s, 2941 m, 232 1600 s, 1550 s, 1504 s, 1 1351 s, 1290 s, 1258 s, 12 1170 s, 1117 s, 1081 s, 10 1000 m, 980 m, 902 w, 8 826 m, 771 m
s - starke m - mittelstarke w - schwache Bande	Der Kurvenverlauf ist identisch im Bereich von 4000 - 700 cm^{-1}	

Tabelle 5

Vergleich der Verbindung A (A nat.) mit dem synthetischen 2'-Glucosy 3,4,4',6'-tetrahydroxychalkon (A synth.).

Tabelle 5 Fortsetzung:

Rf-Werte im System	I	0,76	0,76
	II	0,37	0,37
	III	0,43	0,43
	IV	0,24	0,24

I : Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G "Merck"; Aethylacetat/Aethylmethylketon/Ameisensäure/Wasser, 3:5:1:1

II : Papierchromatographie; n-Butanol/Essigsäure/Wasser, 4:1:5

III : Papierchromatographie; Essigsäure/Wasser, 1:1

IV : Papierchromatographie; Essigsäure/Wasser, 3:7

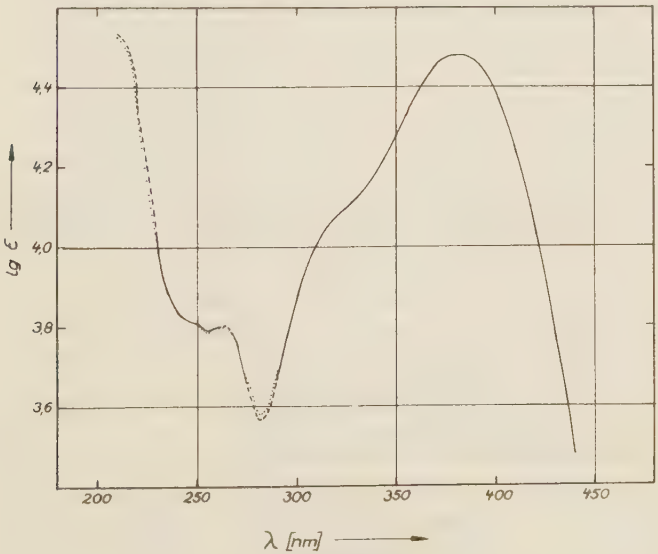


Abbildung 10

UV-Spektren der Verbindung A und des synthetischen 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxychalkons.

in 2'- und 6'-Stellung Hydroxygruppen trägt, von denen mindestens eine glykosidiert ist. Beim Alkaliabbau des Aglykons (F_B) konnte FRENZEL nur eines der Spaltprodukte identifizieren: es handelte sich um Phloroglucin. Der Ring A muß demnach in der Stellungen 2',6' und 4' hydroxyliert sein. Einen Hinweis auf die Substituenten im B-Ring gab der BARGELLINI-Test: Die schwachgelben Kristalle des Aglykons F_B verfärbten sich beim Auflösen in ln Natronlauge rasch über grün nach braun (FRENZEL); das deutet auf das Vorhandensein einer vicinalen Trihydroxygruppierung im Molekül.

Da mir von der Verbindung B nur sehr geringe Mengen (18 mg) zur Verfügung standen, mußte ich meine Untersuchungen auf die wichtigsten Reaktionen beschränken. Zunächst galt es, die Substituenten im B-Ring einwandfrei nachzuweisen. Ich führte daher nochmals einen Alkaliabbau der Verbindung B durch. Da das zu erwartende Reaktionsprodukt (Gallusaldehyd) aber im alkalischen Milieu schon durch Luftsauerstoff sofort zerstört wird, ließ ich die Reaktion unter Reinstickstoff ablaufen. Dadurch gelang es tatsächlich, Gallusaldehyd unter den Spaltprodukten nachzuweisen und chromatographisch zu identifizieren. Der B-Ring enthält also eine vicinale Trihydroxygruppierung,und zwar in den Stellungen 3,4 und 5. Als nächstes wurde das Aglykon F_B acetyliert: die Analyse des Acetats ergab, daß 5 Acetylgruppen in das Molekül eingetreten waren. Damit war die Zahl der insgesamt vorhandenen Hydroxygruppen festgelegt; sie stimmte mit der Zahl der bisher lokalisierten Substituenten überein. Weitere Substituenten waren auch nach der Bruttoformel nicht zu erwarten. Die Verbindung B sollte also ein 2',3,4,4',5,6'-Hexa-hydroxychalkon-2'-glykosid sein. Für diese Anordnung der Hydroxygruppen spricht auch der Schmelzpunkt des Aglykons F_B (253-256°); er stimmt mit dem Schmelzpunkt (250°), den SHINODA, KAWAGOE u. SATO (1931) für ihr synthetisches 3',4',5,5',7-Pentahydroxyflavanon angeben, recht gut überein.

Die Identifizierung des Zuckeranteils war wegen der geringen Substanzmenge nicht mehr durchführbar. Es wurde daher versucht, den endgültigen Strukturbeweis durch Synthese zu führen. Da in

Heterosiden als Zuckeranteil bei weitem am häufigsten die D-Glucose auftritt, wurde zunächst das 2'-Glucosyloxy-3,4,4',5,6'-pentahydroxychalkon synthetisiert und mit der Verbindung B verglichen.

b) Synthese des 2'-Glucosyloxy-3,4,4',5,6'-pentahydroxychalkons und Vergleich mit der natürlichen Verbindung B:

Die Verbindung wurde in Anlehnung an die Vorschrift von ZEMPLEN u. BOGNAR (1942) durch "kalte" alkalische Kondensation (vergl.S.28) von ß-D-Glucosidophloracetophenon mit Gallusaldehyd dargestellt. Die Synthese des Ketons wurde bereits auf S. 45 beschrieben. Die gesamte Reaktionsfolge ist auf S.46 in Formeln wiedergegeben.

Wegen der im alkalischen Milieu außerordentlich großen Empfindlichkeit des Gallusaldehyds gegenüber oxydierenden Agentien mußte während der Reaktion auf peinlichsten Sauerstoffausschluß geachtet werden. Alle Operationen wurden daher unter Reinstickstoff und mit sauerstoffreien Lösungen und Lösungsmitteln durchgeführt. Als Reaktionsgefäß diente ein Schlenkrohr, das mit Reinstickstoff begast und nach Aufnahme aller Reaktionspartner zugeschmolzen wurde.

Das Syntheseprodukt stimmte in allen geprüften Eigenschaften (s.Tab. 6) mit der natürlichen Verbindung B überein. Damit ist die Konstitution von B endgültig bewiesen:

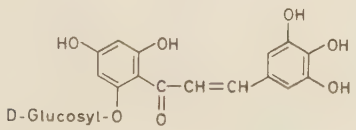


Abbildung 11

Verbindung B

(2'-Glucosyloxy-3,4,4',5,6'-pentahydroxychalkon)

Diese Verbindung ist unseres Wissens bisher weder aus pflanzlichem Material isoliert noch synthetisch dargestellt worden.

	B nat.	B synth.
Schmelzpunkt	175 - 177°	175 - 176°
Misch-Schmelzpunkt	175 - 177°	
Eutektikum mit Benzanilid	161°	161°
Eutektikum mit Salophen	165°	165°
UV-Spektrum *) Inflexion	λ_{max}: 213, 246, 255, 325*) 388 nm ε_{max}: 42400, 8770, 8810, 11000, 29300 $lg\varepsilon_{max}$: 4,63; 3,94; 3,95; 4,08; 4,47	λ_{max}: 213, 246, 255, 325* 388 nm ε_{max}: 42600, 8570, 8850, 12100, 29800 $lg\varepsilon_{max}$: 4,63; 3,93; 3,95; 4,08; 4,47
	Der Kurvenverlauf ist identisch im Bereich von 210 - 450 nm	
IR-Spektrum s = starke m = mittelstarke w = schwache Bande	$\tilde{\nu}_{max}$= 3333 s, 2941 m, 2326 w, 1600 s, 1550 s, 1538 s, 1504 s, 1449 s, 1333s, 1274 s, 1205 s, 1156 s, 1081 s, 1036 s, 1000 m, 980 m, 902 w, 862 m, 840 m, 771 m cm^{-1}	$\tilde{\nu}_{max}$= 3333 s, 2941 m, 2326 1600 s, 1550 s, 1538 1504 s, 1449 s, 1333 1274 s, 1205 s, 1156 1081 s, 1036 s, 1000 980 m, 902 w, 862 840 m, 771 m cm
	Der Kurvenverlauf ist identisch im Bereich von 4000 - 700 cm^{-1}.	

Tabelle 6

Vergleich der Verbindung B (B nat.) mit dem synthetischen 2'-Glucosylox
3,4,4',5,6'-pentahydroxychalkon (B synth.)

Tabelle 6 Fortsetzung:

Rf-Werte im System	I	0,65	0,65
	II	0,26	0,26
	III	0,24	0,24
	IV	0,12	0,12

I : Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G "Merck"; Aethylacetat/Aethylmethylketon/Ameisensäure/Wasser, 3:5:1:1

II : Papierchromatographie; n-Butanol/Essigsäure/Wasser, 4:1:5

III : Papierchromatographie; Essigsäure/Wasser, 1:1

IV : Papierchromatographie; Essigsäure/Wasser, 3:7

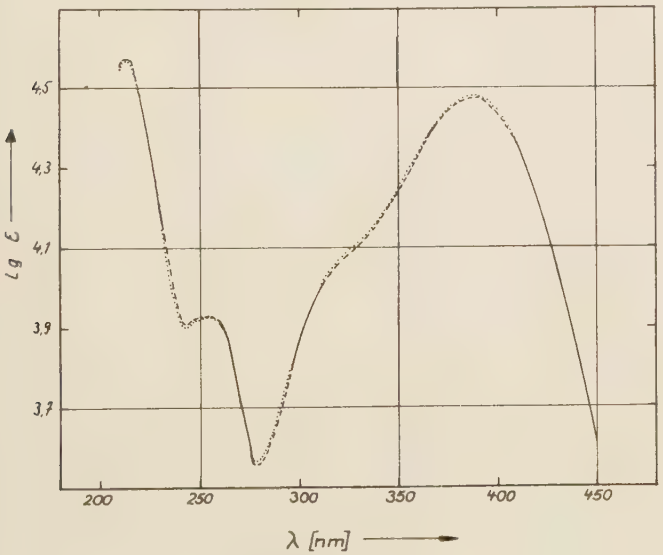


Abbildung 12

UV-Spektren der Verbindung B und des synthetischen 2'-Glucosyloxy-3,4,4',5,6'-pentahydroxychalkons.

V Eigene Untersuchungen:

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L

A l l g e m e i n e s :

Die Blätter von V i t e x a g n u s c a s t u s L. wurden im Herbst 1961 auf der Insel Rhodos gesammelt und sofort nach dem Sammeln an der Sonne getrocknet.

Die Farbsorten von H e l i c h r y s u m b r a c t e a t u m wurden von Herrn Prof. Steiner, dem wir auch an dieser Stelle nochmals sehr für seine Bemühungen danken, in Bonn angebaut. Die Blütenköpfe wurden unmittelbar nach dem Sammeln (im Oktober 1962) im Trockenschrank bei 110° - 120° getrocknet. Das zum Anbau verwendete Samenmaterial stammte von der Fa. BENARY, Hann.-Münden. Die von mir untersuchte gelbe Farbsorte führte die Handelsbezeichnung H e l i c h r y s u m m o n s t r o s u m fl. pleno luteum und die Bestellnummer 17765.

Zur Papierchromatographie fand das Papier Schleicher und Schüll Nr. 2043 bM. Verwendung (Bogen 19 x 19 cm). Es wurde aufsteigend entwickelt.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Platten von 20 x 20 cm Größe verwendet. Die Platten wurden mit dem Streichgerät n. STAHL (Fa. DESAGA) beschichtet; die Schichtdicke des Sorptionsmittels (Kieselgel G "Merck") betrug etwa 300 µ.

Konzentrations- und Verhältnisangaben bei Laufmitteln zur Chromatographie beziehen sich auf Volumina (v/v).

Die Mikroanalysen wurden ausgeführt im Mikroanalytischen Labor A. Bernhardt, Institut für Kohleforschung, Mülheim/Ruhr.

Die IR-Spektren wurden mit einem Leitz-IR-Spektrophotometer aufgenommen. Zur Messung gelangten KBr-Preßlinge.

Die UV-Spektren wurden mit einem Zeiss-Spektrophotometer PMQ II aufgenommen. Die Lösungen befanden sich in Quarzküvetten von 1,000 cm Durchmesser.

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte auf einem Kofler-Heiztischmikroskop.

Das für die Säulenchromatographie verwendete Polyamidpulver (Versuchsprodukt KR 1159), wurde uns freundlicherweise von der BASF, der wir auch an dieser Stelle dafür herzlich danken, zur Verfügung gestellt.

A) Die Flavonoide von Vitex agnus castus:

1.) Verbindung F_3

a) Isolierung aus den Früchten von Vitex agnus castus:

3400 g gemahlener Früchte wurden im Soxhlet mit etwa 30 l Petrolaether (KP 40-60°) 20 Stunden lang extrahiert. Während dieser Zeit hatte sich in der Vorlage eine kompakte gelbe Masse von F_3 (ca. 500 mg) ausgeschieden. Die überstehende Lösung wurde dekantiert und mit frischem Petrolaether auf das eineinhalbfache Volumen verdünnt. Nach zweitägigem Stehen im Eisschrank waren nochmals etwa 100 mg F_3 ausgefallen. Die vereinigten Niederschläge wurden mit Petrolaether gewaschen und aus 96%igem Aethanol umkristallisiert. Ich erhielt so 510 mg derber gelber Prismen vom Schmelzpunkt 188-189°.

Elementaranalyse:

$C_{19}H_{18}O_8$ (374,4); Ber.: C 60,96 H 4,85 4 OCH_3 33,2
Gef.: C 61,33 H 5,00 OCH_3 32,3

Molekulargewicht: Ber.: M = 374,4 Gef.(Rast) : M = 378

UV-Spektrum:

λ_{max}:	258,	272 (Inflex.), 350	nm
ε_{max}:	17800,	15650 , 21200	$1\ Mol^{-1}cm^{-1}$
$lg\ \varepsilon_{max}$:	4,25;	4,19 ; 4,33	

$c = 1{,}63 \cdot 10^{-5}$ Mol l^{-1} in Aethanol

b) Entmethylierung:

150 mg F_3 wurden in einer Mischung von 2,5 ml Phenol/Wasser (10 + 1) und 3,5 ml Jodwasserstoffsäure (d = 1,7) unter Rückfluß 3 Stunden auf 130° erhitzt. Beim Eingießen der abgekühlten Reaktionslösung in 50 ml einer gesättigten wäßrigen Natriumdithionitlösung bildete sich ein gelber Niederschlag (138 mg), der abfiltriert, mit Wasser gewaschen und aus Aethanol unter Zusatz einiger Tropfen Wasser umkristallisiert wurde. Nach achtmaligem Umkristallisieren

erhielt ich 20 mg dunkelgelber Kristalle (= F_3E), die bei etwa 310° unter starker Zersetzung und Schwarzfärbung schmelzen.

Elementaranalyse:

$C_{15}H_{10}O_8$ (318,3) Ber.: C 56,61 H 3,17
Gef.: C 56,35 H 3,20

UV-Spektrum:

λ_{max}: 259 , 361 , 272 (Inflex.) nm
ε_{max}: 17200 , 22100 , 14200 $1\ Mol^{-1}\ cm^{-1}$
$lg\,\varepsilon_{max}$: 4.24 , 4.34 , 4.15

$c = 3{,}74 \cdot 10^{-5}$ Mol l^{-1} in Methanol

Das Spektrum stimmt hinsichtlich der Lage der Maxima und ihrer Intensitäten sehr gut mit dem von BRIGGS u. LOCKER (1951) angegebenen Spektrum des Quercetagetins (3,3',4',5,6,7-Hexahydroxyflavons) überein (s.Tab.2 S.32).

c) Methylierung:

Eine Lösung 3 g Nitroso-methylurethan in 15 ml Aether wurde zum Sieden erhitzt. Dann wurden zu der noch heißen Lösung 4,5 ml 25%igemethanolische Kalilauge langsam zugetropft. Die Tropfgeschwindigkeit wurde so reguliert, daß die Lösung durch die entwickelte Reaktionswärme gerade am Sieden gehalten wurde. Sobald die Reaktion beendet war, wurde das gebildete Diazomethan abdestilliert. Das Destillat wurde in einer mit 50 ml wasserfreiem Aceton gefüllten und gut gekühlten Vorlage aufgefangen. Die acetonig-aetherische Diazomethanlösung wurde zu einer Lösung von 200 mg F_3 in 30 ml wasserfreiem Aceton gegeben und diese Mischung im Tiefkühlfach bei -4° aufbewahrt. Dann wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der braune klebrige Rückstand aus Aethanol umkristallisiert. Die bald darauf ausfallenden Kristalle waren noch kräftig gelb gefärbt. Sie wurden daher papierchromatographisch untersucht (formamidimprägniertes Papier; System: Formamid/Chloroform/Hexan [10:15:85], Oberphase). Es zeigte sich, daß offenbar eine Methylierung stattgefunden hatte; das Methylprodukt (RF 0,57) war

jedoch durch größere Mengen von nichtmethyliertem F_3 (RF 0,08) verunreinigt. Die Verunreinigung ließ sich durch fünfmaliges Umkristallisieren aus Aethanol vollständig entfernen. Ich erhielt so 60 mg feiner hellgelber Nadeln vom Schmelzpunkt 160-162°.

Elementaranalyse:

$C_{20}H_{20}O_8$ (388,4)	Ber.:	C	61,85	H	5,19	5 OCH_3 39,95
	Gef.:	C	61,51	H	5,20	OCH_3 39,08

UV-Spektrum:

λ_{max}: 256 , 273 , 348 nm

ε_{max}: 17400 , 15800 , 22400 $1\ g^{-1}\ cm^{-1}$

$lg\ \varepsilon_{max}$: 4.24 , 4.20 , 4.35

$c = 7.3\ 10^{-3}$ Mol l^{-1} in Aethanol

Das Spektrum stimmt hinsichtlich der Lage der Maxima sehr gut mit dem von HERZ (1961) angegebenen Spektrum des Artemetins (5-Hydroxy-3,3',4',6,7-pentamethoxyflavons) überein (s.Tab.3 S.33). Die Logarithmen der Extinktionskoeffizienten für die Maxima unterscheiden sich allerdings deutlich von den von HERZ angegebenen Werten. Da die Differenzen jedoch bei allen drei Maxima annähernd gleich groß sind, scheint die von mir erhaltene Kurve gegenüber der von HERZ erhaltenen nur parallel verschoben zu sein. Es ist daher trotzdem anzunehmen, daß es sich in beiden Fällen um die gleiche Substanz handelt, zumal das charakteristische Kurvenbild der Verbindung F_3Me genau mit dem von CEKAN und HEROUT (1956) für das Artemetin angegebenen Spektrum übereinstimmt.

d) Alkalispaltung:

50 mg F_3 wurden in 5 ml 10%iger aethanolischer Kalilauge gelöst und 4 Stunden unter Stickstoff am Rückfluß gekocht; dann wurde das Aethanol unter Stickstoff abdestilliert und der Rückstand in 10 ml Wasser gelöst. Die wäßrige Lösung wurde mit 2 n Schwefelsäure angesäuert und 5 mal mit je 5 ml Aether ausgeschüttelt. Die

vereinigten Aetherphasen wurden getrocknet (Na_2SO_4), auf 5 ml eingeengt und chromatographiert (Laufmittel und Rf-Werte siehe Tab. 7). Eines der Spaltprodukte ließ sich einwandfrei als Isovanillinsäure identifizieren.

Substanz	Dünnschichtchrom. (Kieselgel G)		Papierchrom.	
	Rf im Laufmittel		Rf im Laufm.	Farbe mit GIBBS-Reagenz
	BDE	BWE	KEW	
Spalt-produkt	0,35.	0,23	0,81	blau
Iso-vanillin-Säure	0,35	0,23	0,81	blau
Vanillin-säure	0,40	0,35	0,85	blau
Protocat-Säure	0,20	-	0,30	graugrün
Veratrum-säure	0,47	-	0,95	farblos

Tabelle 7

Chromatographischer Vergleich des sauren Reaktionsproduktes beim Alkaliabbau von F_3 mit verschiedenen Phenolcarbonsäuren.

BDE = Benzol/Dioxan/Essigsäure, 90:25:4;
BWE = Di-n Butylaether (wassergesättigt) /Essigsäure, 90:9
KEW = m Kresol/Essigsäure/Wasser, 48:2:50
Farbreaktion: Die Chromatogramme wurden mit einer 0,1%igen Lösung von 2,6-Dichlorchinonchlorimid in absolutem Aethanol besprüht und nach dem Trocknen mit Ammoniakdämpfen behandelt.

2.) Verbindung F_1

a) Isolierung aus den Blättern von Vitex agnus castus:

4,5 kg getrockneter Blätter wurden gepulvert und mit 30 l Methylenchlorid im Soxhlet vorextrahiert bis der Extrakt farblos war. Dann wurde die Droge auf die gleiche Weise mit 30 l Methanol ausgezogen. Der Methanolextrakt wurde im Vakuum auf 900 ml eingeengt und der grüne, zähflüssige Rückstand mit 3 l heißem Wasser durchgeschüttelt. Nach dem Absetzen wurde die überstehende tiefbraune Lösung abgegossen und der Rückstand nochmals mit der gleichen Menge heißem Wasser behandelt. Die vereinigten wäßrigen Lösungen wurden im Vakuum auf 2 l eingeengt und darauf zur weiteren Reinigung 10 mal mit je 500 ml Chloroform ausgeschüttelt, bis die Chloroformphase nur noch schwach grün gefärbt war. Die wäßrige Phase wurde nun auf 1,2 l eingeengt und in einem Perforator etwa 16 Stunden lang mit n-Butanol extrahiert. Die Butanolphase wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit 2,5 l Methanol aufgenommen. Die methanolische Lösung wurde mit der gleichen Menge 2n HCl versetzt und 15 Minuten auf dem Wasserbad zum Sieden erhitzt. Nach dieser Zeit ließ sich papierchromatographisch (Butanol/27%ige Essigsäure, 1:1) noch keine Veränderung der Flavone nachweisen, während die Pseudoindikane bereits völlig zerstört waren; ihre polymerisierten Aglyka konnten durch sofortige Filtration der heißen Lösung entfernt werden. Das Filtrat wurde mit etwa 750 g Natriumkarbonat neutralisiert (p_H 6), im Vakuum auf 600 ml eingeengt und von dem sich ausscheidenden anorganischen Salz abgegossen. Die weitere Auftrennung gelang durch Säulenchromatographie an Polyamidpulver. Die Säulen wurden wie folgt bereitet: 9 Chromatographiersäulen (5,5 cm x 60 cm) wurden mit je 175 g mit reinem Methanol gewaschenem und dann in 50%igen Methanol suspendiertem Polyamidpulver (Versuchsprodukt KR 1159 der BASF) beschickt. Die Schichthöhe betrug nach dem Absitzen etwa 20 cm. Der eingeengte stark getrübte braune Extrakt wurde nun mit der gleichen Menge Methanol versetzt und diese Lösung gleichmäßig auf die 9 Säulen verteilt. Entwicklung und Elution gelang durch Steigerung der Methanolkonzentration zunächst auf 60 % (500 ml je Säule) und

dann auf 70 % (1,5 l je Säule). Das Eluat wurde in Fraktionen zu 200 ml gesammelt und papierchromatographisch (30%ige Essigsäure) auf F_1 geprüft. Die Prüfung ergab, daß die flavonhaltigen Fraktionen noch verunreinigt waren und sowohl F_1 als auch Luteolin-7-glucosid enthielten. Sie wurden daher nochmals, wie oben beschrieben, an Polyamidsäulen getrennt. Diesmal konnte schon im Tageslicht eine deutliche Auftrennung in mehrere gelbe Zonen beobachtet werden. Die zweite dieser Zonen, die im UV-Licht graubraun gefärbt war, enthielt das F_1, die dritte im UV-Licht ebenfalls graubraun erscheinende Zone das Luteolin-7-glucosid. Das Fraktionsvolumen betrug 5o ml, bei der Elution der Übergangszonen 20 ml. Die papierchromatographisch einheitlichen Fraktionen (1,8 l) wurden vereinigt und im Vakuum auf 150 ml eingeengt. Beim Abkühlen entstand ein lockerer hellgelber Niederschlag, der nach dreimaligem Umkristallisieren aus Aethanol/Wasser kleine gelbe nadelförmige Kristallaggregate (315 mg, vom Schmelzpunkt 238-239° lieferte. Der Schmelzpunkt wird durch authentisches Homo-Orientin aus Oxalis cernua nicht erniedrigt.

Elementaranalyse:

Ber.f. $C_{21}H_{20}O_{11}$: C, 56,25; H, 4,50;

Gef. : C, 55,98; H, 5,05.

UV-Spektrum:

λ_{max}:	259,	270,	351	nm
ε'_{max}:	38,6;	40,4;	47,9	$1\ g^{-1}cm^{-1}$
$lg\ \varepsilon'_{max}$:	1,59;	1,61;	1,68	
ε_{max}:	17300;	18100;	21400	$1\ Mol^{-1}cm^{-1}$
$lg\ \varepsilon_{max}$:	4,24;	4,26;	4,33.	

$c = 1{,}1 \cdot 10^{-2}\ g\ l^{-1} = 2{,}46 \cdot 10^{-5}\ Mol\ l^{-1}$ in Methanol

IR-Spektrum:

Die Absorptionsbanden liegen bei folgenden Wellenzahlen:

$\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3445 s, 2985 m, 1655 s, 1625 s, 1585 s,
1490 s, 1460 s, 1350 s, 1315 s, 1265 s,
1220 s, 1190 s, 1175 s, 1160 s, 1125 s,
1090 s, 1025 s, 980 m, 960 w, 885 m,
840 m, 815 m, 780 m, 770 m, 680 m.

s = starke, m = mittelstarke, w = schwache Bande

c = 3 mg F_1 / 800 mg KBr

Das Spektrum ist mit dem authentischen Homo-Orientinsaus Oxalis cernua im untersuchten Wellenzahlenbereich (4000 - 670 cm^{-1}) identisch.

b) Enzymatische Hydrolyse:

Je 5 ml gesättigter wäßriger Lösungen von F_1 und Luteolin-7-glucosid wurden mit je 2 mg folgender Enzympräparate versetzt: kristallisierter ß-Glucosidase (Fa. FLUKA, Büchi/Schweiz), rohem Emulsin (Fa. ROTH, Karlsruhe) und einem Hydrolasengemisch (Fa.BOEHRINGER, Mannheim). Nach 48stündigem Aufbewahren bei 35° wurde jede Lösung dreimal mit je 2 ml Aether ausgeschüttelt. Die wäßrigen und die aetherischen Phasen wurden getrennt papierchromatographisch (Essigester/Ameisensäure/Wasser, 10:2:3) auf Flavonoide untersucht. Während vom Luteolin-7-glucosid unter diesen Bedingungen in allen Fällen nur noch das Aglykon in der Aetherphase nachzuweisen war, enthielten die Aetherausschüttelungen der F_1-Lösungen in keinem Fall ein Flavon; dagegen war in den wäßrigen Phasen noch das unveränderte Ausgangsprodukt vorhanden. Es zeigte sich also, daß das F_1 unter Bedingungen, bei denen ein normales ß-Glucosid (Luteolin-7-glucosid) quantitativ hydrolysierbar ist, von den verwendeten Enzympräparaten nicht angegriffen wird.

c) Säure-Hydrolyse

α) Prüfung auf Zucker:

50 mg Homo-Orientin wurden in wenig Methanol gelöst und mit 10 ml 8%iger Schwefelsäure versetzt. Die Mischung wurde 2 Stunden

im siedenden Wasserbad erhitzt, dann in der Wärme mit Bariumkarbonat neutralisiert und anschließend zentrifugiert. Die überstehende klare Lösung wurde abgegossen, auf 1 ml eingeengt und filtriert. Die pc Prüfung des Filtrats auf Zucker verlief negativ (System: Pyridin/Essigester/Wasser, 1:2:2).

ß) Prüfung auf Flavonoide (Aglyka):

5 mg F_1 wurden in 7,5 ml Methanol gelöst und mit der gleichen Menge 2n HCl versetzt. Diese Lösung wurde 6 Stunden im Sieden gehalten, danach auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens eingeengt und mit Wasser wieder auf 15 ml aufgefüllt. Dann wurde 5 mal mit je 5 ml Butanol ausgeschüttelt. Die vereinigten Butanolphasen wurden 10 mal mit je 2,5 ml Wasser säurefrei gewaschen, auf 5 ml eingeengt und zur PC verwendet (Rf-Werte und Laufmittel siehe Tabelle 8). Es zeigte sich, daß die Lösung neben F_1 eine zweite flavonoide Substanz (= F_i) ähnlicher Polarität enthielt. Eine Substanz, deren Rf-Wert auf ein Aglykon schließen ließe, konnte nicht nachgewiesen werden. Es war also wahrscheinlich keine Hydrolyse, sondern eine Isomerisierung eingetreten.

d) Abtrennung des Isomerisierungsproduktes F_i von F_1 :

30 g Cellulosepulver (WHATMAN, standard grade) wurde in 200 ml der Oberphase des Systems 0,2m KH_2PO_4/Butanol/Benzol (10:16:4) suspendiert und die Mischung unter kräftigem Rühren mit 16,5 g Unterphase versetzt. Die Suspension wurde dann bei geöffnetem Hahn anteilweise in eine zur Hälfte mit Oberphase gefüllte Chromatographiersäule (3,5 x 60 cm) gegeben und jeweils nach dem Absitzen festgedrückt. Die Schichthöhe der fertigen Säule betrug 40 cm.

5 mg F_1 wurden in 7,5 ml Methanol gelöst, mit 7,5 ml 2n HCl versetzt und durch 8 stündiges Kochen auf dem Wasserbad isomerisiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte, wie schon bei der Säurehydrolyse beschrieben. Die neutrale Butanol-Ausschüttelung wurde dann mit 2 g Cellulosepulver verrieben und das Butanol anschließend im Vakuum bei 40° entfernt. Das trockne Pulver wurde in 10 ml Oberphase suspendiert, mit 1,1 g Unterphase versetzt, auf die fertige Säule

geschichtet und festgedrückt. Nun wurde mit insgesamt 450 ml Oberphase entwickelt und eluiert. Die Abtropfgeschwindigkeit betrug 0,8 ml/Min., das Fraktionsvolumen 7 ml. Im Tages- und im UV-Licht ließ sich die Trennung der beiden Substanzen gut verfolgen: Im unteren Teil der Säule hatten sich zwei deutlich voneinander abgegrenzte Zonen ausgebildet, die auch getrennt eluiert werden konnten. Die F_i-haltigen Fraktionen - entsprechend der langsamer wandernden Zone - wurden vereinigt, zur Trockne eingeengt und dann mit 5 ml Methanol aufgenommen. Der pc Vergleich dieser Lösung mit authentischem Orientin aus Oxalis cernua ergab volle Übereinstimmung der Rf-Werte beider Substanzen (s.Tab.8).

e) Partielle Rückverwandlung des Isomerisierungsproduktes F_i in F_1:

Auf die bereits beschriebene Weise wurden 5 mg Homo-Orientin isomerisiert und die Reaktionsprodukte chromatographisch getrennt. Die zur Trockne eingeengten F_i-haltigen Fraktionen wurden dann mit 7,5 ml Methanol aufgenommen und nach Zusatz von 7,5 ml 2n HCl 8 Stunden auf dem Wasserbad gekocht. Die Aufarbeitung der Reaktionslösung erfolgte wie bei der Säurehydrolyse beschrieben. In der Butanol-Ausschüttelung ließ sich pc neben unverändertem F_i eindeutig Homo-Orientin nachweisen. (Laufmittel und Rf-Werte siehe Tabelle 8).

Substanz	Rf im Laufmittel				
	I	II	III	IV	V
Homo-Orientin *) = F_1	0,33	0,56	0,61	0,39	0,73
Homo-Orientin **)	0,33	0,56	0,61	0,39	0,73
Homo-Orientin ***)	0,40	0,56	0,66	-	-
Orientin *) = F_i	0,16	0,41	0,50	0,32	0,63
Orientin ****)	0,16	0,41	0,50	0,32	0,63
Orientin ***)	0,19	0,39	0,54	-	-

I = Essigsäure (15proz.)
II = Essigsäure (30proz.)
III = Butanol/Essigsäure (27proz.), (1:1)
IV = Essigester/Ameisensäure/Wasser (10:2:3)
V = Essigsäure/Wasser/Salzsäure (25proz.) (30:10:3)

Tabelle 8

Rf-Werte des Homo-Orientins und seines Isomerisierungsproduktes F_i.

*) Aus Vitex, eigene Werte.
**) Aus Aspalathus, eigene Werte.
***) Aus Hordeum, n.Seikel und Bushnell.
****) Aus Oxalis, eigene Werte.

f) Reduktive Spaltung der C-glykosidischen Bindung von F_1:

20 mg Homo-Orientin wurden in 0,32 ml Phenol und 0,4 ml Jodwasserstoffsäure (d=1,7) gelöst und die Lösung 8 Stunden in schwachem Sieden erhalten. Nach dem Abkühlen wurde die dunkelbraune Flüssigkeit in 6 ml gesättigte Natriumdithionitlösung gegossen. Es fiel ein amorpher gelber Niederschlag (4,8 mg) aus. Bei der Chromatographie einer methanolischen Lösung dieses Reaktionsproduktes mit Luteolin war in 5 verschiedenen Laufmitteln keine Trennung der beiden Substanzen zu beobachten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Substanz	Rf im Laufmittel				
	I	II	III	IV	V
A_x	0,26	0,24	0,86	0,94	0,67
Luteolin	0,26	0,24	0,86	0,94	0,67

I = Isopropanol/Ameisensäure/Wasser, 2:5:5
II = Essigsäure (30proz.)
III = Butanol/Essigsäure (27proz.), 1:1
IV = Essigester/Ameisensäure/Wasser, 10:2:3
V = Essigsäure/Wasser/Salzsäure (25proz.), 30:10:3

Tabelle 9

Vergleich des bei der Spaltung von Homo-Orientin mit Jodwasserstoffsäure entstandenen "Aglykons" (A_x) mit Luteolin

B) Die Chalkonglykoside von Helichrysum bracteatum (VENT.) WILLD

1.) Isolierung der Verbindungen A und B aus den Hüllblättern einer gelben Sorte von Helichrysum bracteatum:

100 g der getrockneten Hüllblätter einer gelben Sorte (Näheres s.S.55) von Helichrysum bracteatum wurden 8 Stunden im Soxhlet mit Petrolaether (Kp. 40-60°) vorextrahiert; der Extrakt wurde verworfen. Dann wurde die Droge 12 Stunden lang mit Aceton ausgezogen. Um unter möglichst schonenden Bedingungen zu arbeiten, wurde der Extrakt alle 2 Stunden entnommen und durch frisches Lösungsmittel, in dem etwa 5 g Calciumcarbonat suspendiert wurden, ersetzt. Die vereinigten Acetonextrakte wurden im Vakuum eingeengt. Sie lieferten insgesamt 18,6 g Trockenrückstand.

12 g des Trockenextraktes wurden an 3 Polyamidsäulen chromatographiert. Die Säulen wurden wie folgt bereitet: 480 g Polyamidpulver (Versuchsprodukt KR 1159 der BASF) wurden in großen Chromatographiesäulen solange mit Methanol gewaschen, bis beim Verdampfen des Eluats kein Rückstand mehr verblieb. Dann wurde das Pulver bei Zimmertemperatur getrocknet. Je 160 g des so vorbereiteten Polyamids wurden in 70%igem Methanol suspendiert und diese Suspension in einem Guß in eine Chromatographiesäule von 6 cm ∅ gegeben; nun wurde der Hahn der Säule erst wenig, später mehr geöffnet, bis sich das Polyamid abgesetzt hatte und die überstehende Flüssigkeit eingesickert war. Die Höhe der Schicht betrug dann etwa 20 cm. Der Trockenextrakt (12 g) wurde in 150 ml Methanol gelöst. Die Lösung wurde bis zur beginnenden Trübung mit Wasser (etwa 30 ml) versetzt und gleichmäßig auf die 3 Säulen verteilt. Nach dem Einsickern wurde zunächst mit 70%igem Methanol entwickelt, bis die vorauslaufenden gelben Zonen - sie enthalten hauptsächlich Flavonglykoside - eluiert waren (Lösungsmittelverbrauch etwa 1,1 l pro Säule). Dann wurden mit reinem Methanol die hellbraunen bis rötlich-braunen, nicht scharf voneinander getrennten Zonen der Anthochlorglykoside A, B und C[+)] eluiert.

+) Die Verbindung C, für die der Name Bractein vorgeschlagen wurde, konnte bereits von ALBRECHT 1962 aus der gleichen Pflanze isoliert werden. Die Konstitutionsaufklärung gelang HANSEL u.LANGHAMMER 1963: Bractein ist das 3',4,4',5',6-Pentahydroxyauron-4-glucosid.

Das Eluat wurde in Anteilen zu 50 ml gesammelt und dünnschichtchromatographisch geprüft (Kieselgel G "Merck"; Essigester/Aethylmethylketon/Ameisensäure/Wasser, 5:3:1:1). Die Chromatogramme bestätigten, was auf Grund der ineinander übergehenden Zonen bereits zu erwarten war: weder die Abtrennung der Flavone von den Anthochlorpigmenten, noch die Trennung der Anthochlore voneinander war vollständig erfolgt. Die Verbindung C ließ sich offenbar unter den von mir geschaffenen Bedingungen nicht von den Verbindungen A und B abtrennen; sie war in allen anthochlorhaltigen Anteilen des Eluats in etwa gleicher Konzentration enthalten. Die Verbindungen A und B kamen jedoch in den einzelnen Anteilen in unterschiedlichen Konzentrationen vor: in den ersten Anteilen überwog bei weitem die Verbindung A, während in den letzten Anteilen die Verbindung B überwog. Da die A-Konzentration langsamer ab-, die B-Konzentration aber rasch zunahm, erhielt ich jeweils 4 - 5 Zwischenfraktionen, die beide Verbindungen in etwa gleicher Menge enthielten. Das Eluat wurde daher in die folgenden 3 Fraktionen aufgeteilt: 1.) Im V o r l a u f wurden alle Anteile vereinigt, die noch keine Anthochlore enthielten. Diese Fraktion wurde verworfen. 2.) Die F r a k t i o n 1 umfaßte alle Anteile, welche die Verbindungen A und C neben wenig B und einem Teil der Flavone enthielten; sie wurde im Vakuum auf 20 ml eingeengt und nochmals an einer Polyamidsäule chromatographiert. 3.) Die F r a k t i o n 2 bestand aus den Anteilen, welche die Verbindungen B und C neben wenig oder etwa der gleichen Menge A enthielten; sie wurde im Vakuum auf 40 ml eingeengt und nochmals an Polyamidsäulen chromatographiert.

Zur Chromatographie der Fraktion 1 wurde eine Säule (Ø 4,5 cm 100 g Polyamid) benötigt. Entwickelt und eluiert wurde ebenso, wie es für den Gesamtextrakt beschrieben ist. Diesmal war die Trennung der hellbraunen A-haltigen von der gelben flavonhaltigen und der rötlich-braunen B-haltigen Zone scharf. Die mittleren Anteile des

Eluats enthielten dementsprechend nur noch die Verbindungen A und C neben unbekannten Verunreinigungen. Sie wurden vereinigt (= Fraktion 1 ') und zur Trockne eingeengt (i.V.). Die weitere Auftrennung dieser Fraktion erfolgte durch Verteilungschromatographie an Cellulosesäulen.

Für die Fraktion 2 wurden 2 Säulen (Ø 4,5 und 6 cm; 100 g bzw. 150 g Polyamid) benötigt. Entwickelt und eluiert wurde, abweichend von der Chromatographie des Gesamtextraktes und der Fraktion 1, von Anfang an mit reinem Methanol. Die Trennung der hellbraunen von der rötlich-braunen Zone war auch in diesem Fall scharf. Die ersten Anteile des Eluats enthielten nur die Verbindungen A und C neben unbekannten Verunreinigungen; sie wurden zur Trockne eingeengt und mit der Fraktion 1 ' vereinigt. Die folgenden Anteile enthielten nur die Verbindungen B und C neben unbekannten Verunreinigungen; sie wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Die weitere Auftrennung dieser Fraktion (=Fraktion 2') erfolgte ebenfalls durch Verteilungschromatographie an Cellulosesäulen.

Die Cellulosesäulen wurden wie folgt bereitet; Zunächst wurde das Gleichgewicht zwischen den beiden Phasen des Lösungsmittelsystems (für Fraktion 1': Methylaethylketon/Benzol/Wasser; 8:2:5; für Fraktion 2': Aethylmethylketon/Benzol/Wasser, 9:1:5) durch 1stündiges mechanisches Schütteln eingestellt. Dann wurden je 200 g Cellulosepulver (Whatman, standard grade) in etwa 600 ml Oberphase des betreffenden Systems suspendiert. In die Suspension wurden unter kräftigem Rühren 110 g (= 55 %) Unterphase langsam aus einem Tropftrichter zugegeben. Der dabei entstandene Brei wurde in etwa 10 Portionen in eine Chromatographiesäule (Ø 5,5 cm) gegossen und die Cellulose jeweils nach dem Absitzen festgedrückt. Die Schichthöhe der fertigen Säulen betrug etwa 23 cm. Der Verdampfungsrückstand der Fraktionen 1' bzw. 2' wurde in 100 ml der entsprechenden Oberphase gelöst und diese Lösung vorsichtig auf den Säulenkopf geschichtet. Nach dem Einsickern wurde mit frischer Oberphase entwickelt und eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 30 ml aufgefangen und dünnschichtchromatographisch (s.o.) geprüft. Die

Prüfung ergab, daß sowohl A als auch B vollständig von C getrennt war: die A-haltigen und die B-haltigen Fraktionen waren chromatographisch fast rein. Sie wurden jeweils vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Die Rückstände wurden in je 20 ml heißem Wasser gelöst und die Lösungen 48 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Nach dieser Zeit war die Verbindung A als hellgelber mikrokristalliner Niederschlag und die Verbindung B als orangerote amorphe Kruste ausgefallen. Die Niederschläge wurden abfiltriert und je 5 mal aus wenig Wasser umkristallisiert.

Ich erhielt so 257 mg der Verbindung A und 18 mg der Verbindung B. Beide Verbindungen kommen in mindestens zwei Formen, die jeweils verschiedene Schmelzpunkte haben, vor:

Die Verbindung A kristallisiert meist in kleinen gelben Nadeln vom Schmelzpunkt 165-166°. Manchmal, vor allem aus konzentrierten Lösungen, erhält man dagegen sehr lange orangefarbene Nadeln vom Schmelzpunkt 171-173°. Beide Formen lassen sich ineinander überführen.

Die Verbindung B kristallisiert meist in Form unregelmäßiger gelber Prismen vom Schmelzpunkt 175-177°. Manchmal, auch hier vor allem aus konzentrierten Lösungen, kristallisiert die Verbindung jedoch in feinen orangefarbenen Nadeln vom Schmelzpunkt 201-204°. Auch in diesem Fall lassen sich beide Formen ineinander überführen.

Alle im folgenden angegebenen Daten beider Verbindungen beziehen sich auf die anscheinend stabileren niedriger schmelzenden Formen.

Eutektika:

Verbindung A	mit	Phenacetin	: 113°
" A	"	Benzanilid	: 148°
" B	"	Benzanilid	: 161°
" B	"	Salophen	: 165°

Elementaranalyse:

Verbindung A

Ber. f. $C_{21}H_{22}O_{11}$: C, 56,00; H, 4,92; O, 39,08.

Gef. : C, 55,35; H, 5,21; O, 39,25.

Verbindung B

Ber. f. $C_{21}H_{22}O_{12}$: C, 54,08; H, 4,76.

Gef. : C, 53,69; H, 5,09.

Die Substanzen wurden vor der Analyse quantitativ im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

UV-Spektren:

Die Substanzen wurden vor der Messung bei 100° im Vakuum getrocknet.

Verbindung A

λ_{max}: 209, 248, 261, 325*), 383 nm

ε_{max}: 36600, 6780, 6370, 12500 , 30300 $1\ Mol^{-1}cm^{-1}$

$lg\,\varepsilon_{max}$: 4,56; 3,83; 3,80; 4,10; 4,48.

$c = 1{,}28 \cdot 10^{-2}$ g $l^{-1} = 2{,}84 \cdot 10^{-5}$ Mol l^{-1}

Verbindung B

λ_{max}: 213, 246, 255, 325*), 388 nm

ε_{max}: 42400, 8770, 8810, 11000 , 29300 $1\ Mol^{-1}cm^{-1}$

$lg\,\varepsilon_{max}$: 4,63; 3,94; 3,95; 4,08 ; 4,47.

$c = 9{,}6 \cdot 10^{-3}$ g $l^{-1} = 2{,}06 \cdot 10^{-5}$ Mol l^{-1} in Aethanol

*) Inflexion

IR-Spektren:

Verbindung A

$\tilde{\nu}$ = 3333 s, 2941 m, 2326 w, 1600 s, 1550 s, 1504 s, 1449 s, 1351 s, 1290 s, 1258 s, 1205 s, 1170 s, 1117 s, 1081 s, 1036 s, 1000 m, 980 m, 902 w, 862 m, 826 m, 771 m cm^{-1}

c = 3 mg/800 mg KBr.

Verbindung B

$\tilde{\nu}$ = 3333 s, 2941 m, 2326 w, 1600 s, 1550 s, 1538 s, 1504 s, 1449 s, 1333 s, 1274 s, 1205 s, 1156 s, 1081 s, 1036 s, 1000 m, 980 m, 902 w, 862 m, 840 m, 771 m cm^{-1}

c = 3 mg/800 mg KBr.

s = starke, m = mittelstarke, w = schwache Bande

2.) Identifizierung der Verbindung A

a) Acetylierung:

53 mg A wurden in 1,5 ml Pyridin gelöst; die Lösung wurde unter Eiskühlung mit 1,5 ml Acetanhydrid versetzt und dann 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Danach wurde das Reaktionsgemisch in 20 ml eisgekühltes Wasser gegossen. Der sofort ausfallende klebrige Niederschlag wurde nach dem Hartwerden (ca. 4 Stunden) abgesaugt, mit Eiswasser gut gewaschen, scharf abgesaugt und im Vakuumexsikkator getrocknet. Nach 3maligem Umkristallisieren des trockenen farblosen Pulvers aus absolutem Aethanol erhielt ich 49 mg farbloser Kristalle vom Schmelzpunkt 152-154°.

Elementaranalyse:

Ber. f. $C_{37}H_{38}O_{19}$ (M 786,7) : C, 56,54; H, 4,88; 8 CH_3CO, 43,70;
Gef. : C, 56,97; H, 4,91; CH_3CO, 46,04.

UV-Spektrum:

λ_{max}: 300 nm

ε_{max}: 21400 l $Mol^{-1} cm^{-1}$

$lg\varepsilon_{max}$: 4,33

$c_1 = 3{,}18 \cdot 10^{-5}$ Mol l^{-1} in Aethanol
$c_2 = 6{,}36 \cdot 10^{-5}$ Mol l^{-1}

b) Säure-Hydrolyse:

α) Isolierung des Aglykons F_A

Die kräftig gelb gefärbte Lösung von 100 mg A in 7 ml 0,5 n Schwefelsäure wurde 15 Minuten unter Rückfluß gekocht. Während der Reaktion hellte sich die Farbe der Lösung immer mehr auf, bis zu einem schwachen Hellgelb. Nach dem Erkalten fiel das Aglykon als hellgelber feiner kristalliner Niederschlag aus (53 mg), der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde zum Nachweis des Zuckers verwandt. 13 mg des Niederschlages wurden 3 mal aus 40%igem Methanol umkristallisiert. Ich erhielt so fast farblose Kristalle vom Schmelzpunkt 265-270°. (Eriodictyol schmilzt nach Karrer (1958) bei 262-267°).

ß) Acetylierung des Aglykons F_A

35 mg des F_A-Rohproduktes wurden in 1 ml Pyridin gelöst, unter Eiskühlung mit 1 ml Acetanhydrid versetzt und darauf 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dann wurde das Reaktionsgemisch in 15 ml eiskaltes Wasser gegossen. Der zunächst klebrige Niederschlag verfestigte sich innerhalb 4 Stunden und wurde dann abgesaugt. Nach gutem Auswaschen mit Eiswasser und sorgfältigem Trocknen im Vakuumexsikkator wurde der Niederschlag dreimal aus absolutem Aethanol umkristallisiert. Ich erhielt 26 mg farbloser Kristalle vom Schmelzpunkt 141-142°. (Eriodictyol-Tetraacetat schmilzt nach GEISSMAN u. CLINTON, 1946 bei 138-139°).

Elementaranalyse:

Ber. f. $C_{23}H_{20}O_{10}$: C, 60,52; H, 4,42; 4 CH_3CO, 37,10
Gef. : C, 60,32; H, 4,41; CH_3CO, 40,03

UV-Spektren:

λ_{max}: 219, 259, 314 nm
ε_{max}: 44000, 11580, 3710 1 $Mol^{-1}cm^{-1}$
lg ε_{max}: 4,64, 4,20, 3,57

Nach GEISSMAN (1955) weist das UV-Spektrum von Naringenin-Triacetat folgende Extremwerte auf (Vergl.S.44):

λ_{max}: 218, 259, 315 nm
lg ε_{max}: 4,61; 4,08; 361

γ) Alkalispaltung von F_A

5 mg des F_A-Rohproduktes wurden in 5 ml kalt gesättigter wäßriger Barytlauge gelöst und drei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit 10%iger Salzsäure angesäuert und viermal mit je 5 ml Aether ausgeschüttelt. Die Aetherphasen wurden auf 5 ml eingeengt und zur Papierchromatographie verwandt. Die Rf-Werte zweier Spaltprodukte stimmten in 3 verschiedenen Laufmitteln genau mit denen von Phloroglucin bzw. Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) überein (s.Tab.10).

Substanz	Rf im System		
	I	II	III
Spaltprodukt 1	0,60	0,16	0,70
Phloroglucin	0,60	0,16	0,70
Spaltprodukt 2	0,30	0,50	0,86
Kaffeesäure (3,4-Dihydroxy-benzoesäure)	0,30	0,50	0,86

I = Essigsäure/Wasser (2,5:97,5)
II = m-Kresol/Essigsäure/Wasser (48:2:50)
III = n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5)

Tabelle 10

Papierchromatographischer Vergleich der beim Alkali-Abbau von F_A entstehenden Spaltprodukte mit authentischen Verbindungen.

δ) Nachweis des Zuckers:

Die nach der Entfernung des Aglykons verbleibende Hydrolyseflüssigkeit wurde mit Di-n-Octylamin (ca. 2,5 ml) neutralisiert; dabei fiel ein voluminöser Niederschlag aus, der abfiltriert und zweimal mit je 1,5 ml Wasser ausgewaschen wurde. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt und zur Entfernung von überschüssigem Di - n-Octylamin dreimal mit je 2,5 ml Essigester ausgeschüttelt und dann im Vakuum auf 2 ml eingeengt.

1 ml der neutralisierten zuckerhaltigen Lösung wurde mit 1 ml einer Lösung von 2 g Phenylhydrazinhydrochlorid und 3 g wasserfreiem Natriumacetat in 20 ml Wasser versetzt und die Mischung 1 Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Abscheidung des Osazons begann schon in der Wärme und wurde dann beim Erkalten vollständig. Der gelbe kristalline Niederschlag wurde abgesaugt und dreimal aus 70%igem Aethanol umkristallisiert; er wies dann einen Schmelzpunkt von 207-209° auf, der durch authentisches Glucosazon (Schmelzpunkt 209-210°) nicht erniedrigt wurde.

Je 50 µl der neutralisierten zuckerhaltigen Lösung wurde auf die Startpunkte von 3 Papierchromatogrammen aufgetragen; entwickelt

wurde mit folgenden Laufmitteln: Phenol, wassergesättigt (=I); n-Butanol/Pyridin/Wasser, 6:4:3 (=II); Butanol/Essigsäure/Wasser, 4:1:5 (=III). Die Flecke wurden durch Besprühen mit einer Lösung von 0,93 g Anilin und 1,66 g Phthalsäure in 100 ml wassergesättigtem n-Butanol und anschließendes Erhitzen des Chromatogramms auf 105° sichtbar gemacht. Die Rf-Werte des bei der Hydrolyse von A abgespaltenen Zuckers stimmte in allen drei Laufmitteln genau mit denen der mitlaufenden authentischen Glucose überein (s.Tab. 11).

Substanz	Rf im System		
	I	II	III
Rhamnose	0,66	0,72	0,43
Galactose	0,46	0,56	0,15
Glucose	0,43	0,57	0,20
A - Zucker	0,43	0,57	0,20

I = Phenol, wassergesättigt
II = n Butanol/Pyridin/Wasser, 6:4:3
III = n Butanol/Essigsäure/Wasser, 4:1:5

Tabelle 11

Papierchromatographischer Vergleich des bei der Hydrolyse von A abgespaltenen Zuckers mit einigen authentischen Monosacchariden.

c) Synthese des 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxychalkons.

α) 4-Benzoylphloracetophenon (n. CANTER, CURD u. ROBERTSON, 1931):

20 g Phloracetophenon wurden in 400 ml einer 2,1%igen (=0,374n) Kalilauge bei Zimmertemperatur gelöst. Die hellbraune Lösung wurde mit einer Eis-Kochsalz-Mischung auf -1° abgekühlt und dann mit insgesamt 16,8 g Benzoylchlorid in sechs gleichen Portionen versetzt. Nach jeder Zugabe wurde etwa 2 Min. sehr kräftig geschüttelt und dann wieder auf -1° abgekühlt; das Schütteln und Abkühlen wurde sooft wiederholt, bis der Geruch nach Benzoylchlorid fast verschwunden war (ca. 2 mal), dann wurde die nächste Portion Benzoylchlorid zugesetzt. Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz in 500 ml gesättigter

Natriumbikarbonatlösung gegossen. Nach 2 Stunden wurde der weiße plastische Niederschlag abfiltriert, gut mit Wasser ausgewaschen und dann in Aether aufgenommen. Die aetherische Lösung wurde zweimal mit je 200 ml 10%iger Natriumkarbonatlösung ausgeschüttelt, mit Wasser neutral gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und dann im Vakuum zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde viermal aus Methanol umkristallisiert und lieferte dann 4,6 g farbloser Kristallplättchen vom Schmelzpunkt 209-211°.

Drei weitere Ansätze mit den gleichen Mengen an Ausgangsmaterialien lieferten noch insgesamt 14 g Benzoylphloracetophenon.

ß) 2-(Tetraacetyl-D-glucosido)-4-benzoylphloracetophenon (n. ZEMPLEN u. BOGNAR, 1942):

In eine Lösung von 1,2 g Kaliumhydroxyd in 18 ml Wasser wurde unter Eiskühlung 3,6 g 4-Benzoylphloracetophenon eingetragen; dann wurde ebenfalls unter Eiskühlung eine Lösung von 8,2 g Acetobromglucose in 18 ml Aceton und schließlich noch weitere 18 ml Aceton zugesetzt. Die gelbe homogene Lösung wurde 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, wobei sich lange farblose Nadeln ausschieden und die Lösung sich rötlich verfärbte. Die letzten sechs Stunden wurde die Mischung auf der Maschine geschüttelt, dann in 600 ml Wasser gerührt, das 0,9 ml Essigsäure enthielt. Die zunächst plastische Fällung wurde nach 20 Stunden hart; sie ließ sich dann zu einem Pulver zerstampfen, das abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen und dann aus 80 ml Methanol kristallisiert wurde. Die Kristalle wurden nach 8 Stunden abgesaugt und zur weiteren Reinigung mit 16 ml Chloroform erwärmt. Dabei geht die gesuchte Verbindung in Lösung, während etwa noch vorhandenes 4-Benzoylphloracetophenon ungelöst bleibt. Es wurde filtriert, mit 5 ml Chloroform nachgewaschen, das Filtrat auf 7-8 ml eingeengt und mit 25 ml warmem Methanol versetzt; sofort begann die Abscheidung von farblosen Nadeln, die nach 12 Stunden abgesaugt und getrocknet wurden. Ich erhielt so 1,6 g Tetraacetylglucosido-4-benzoylphloracetophenon vom Schmelzpunkt 176-177°.

4 weitere Ansätze mit den gleichen Mengen an Ausgangsmaterialien lieferten noch insgesamt 6,3 g der gleichen Verbindung.

γ) 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-Tetrahydroxychalkon:

1,2 g 2-(Tetraacetylglucosido)-4-benzoylphloracetophenon wurden unter Stickstoff in einem Schlenkrohr mit 1,5 ml sauerstoffreiem Aethanol+) vermischt; dann wurden unter Eiskühlung 10 ml 60%ige (=10,7 n) sauerstoffreie Kalilauge+) zugefügt und 10 Minuten im Eisbad geschüttelt; als sich eine homogene farblose Lösung gebildet hatte, wurden 420 mg Protocatechualdehyd und noch 1 ml sauerstoffreies Aethanol+) zugegeben und dann das Schlenkrohr zugeschmolzen. Das verschlossene Gefäß wurde 40 Stunden mechanisch geschüttelt und weitere 40 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt; dann wurde es unter Stickstoff geöffnet und der Inhalt unter Eiskühlung mit 16 ml sauerstoffreiem Wasser+) versetzt und darauf mit eiskalter sauerstoffreier 10%iger Salzsäure+) bis zum Farbumschlag der dunkelroten Lösung nach gelb angesäuert. Die saure Lösung wurde noch 30 Minuten im Eisbad belassen; dann wurde die ausgeschiedene Benzoesäure abfiltriert und das Filtrat 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Da das Chalkon nach dieser Zeit nicht ausgefallen war, wurde die Lösung über eine kurze Perlonsäule (⌀ 1,5 cm, Höhe 5 cm) filtriert und die Säule mit 150 ml Wasser nachgewaschen; unter diesen Bedingungen bleibt das Chalkon am Kopf der Säule adsorbiert, während die Verunreinigungen weiter wandern und zum Teil (Säuren und Salze) die Säule wieder verlassen. Die im UV-Licht braun gefärbte chalkonhaltige Zone wurde nach Herausstoßen des Säulenmaterials abgetrennt und dann mit kaltem Methanol eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen. Die wäßrige Lösung wurde 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt; dann hatte sich das Chalkon als feiner hellgelber Niederschlag abgeschieden, der abfiltriert und 8 mal aus Wasser umkristallisiert wurde. Ich erhielt 28 mg feiner gelber Nadeln vom Schmelzpunkt 165-166°. Der Schmelzpunkt wird durch die Verbindung A nicht erniedrigt: der Mischschmelzpunkt liegt bei 164-166°.

+) Die Lösungen und Lösungsmittel wurden durch 30minütiges Kochen am Rückfluß und gleichzeitiges Durchleiten eines kräftigen Stickstoffstromes sauerstoffrei gemacht und dann mit einer mit Stickstoff gefüllten Pipette in das Reaktionsgefäß überführt.

Das Eutektikum mit Phenacetin liegt bei 113°; das Eutektikum mit Benzanilid liegt bei 148°.

Auch von der synthetischen Verbindung kann man durch Kristallisation aus konzentrierten Lösungen die orangefarbenen Nadeln der höherschmelzenden Form (Schmelzpunkt 171-173°) erhalten (vergl.S. 69).

Elementaranalyse:

Ber. f. $C_{21}H_{22}O_{11}$: C, 56,00; H, 4,92

Gef. : C, 56,16; H, 5,21

UV-Spektrum:

Die Substanz wurde vor der Messung bei 100° im Vakuum getrocknet.

λ_{max}: 209, 248, 261, 325*), 383 nm

ε_{max}: 36200, 6810, 6360, 12500 , 30300 $l\ Mol^{-1}cm^{-1}$

$lg\varepsilon_{max}$: 4,56; 3,83; 3,80; 4,10 ; 4,48.

$c = 1{,}28 \cdot 10^{-2}\ g\ l^{-1} = 2{,}85 \cdot 10^{-5}\ Mol\ l^{-1}$ in Aethanol

*) Inflexion

Das Spektrum ist identisch mit dem der Verbindung A im Bereich von 210 - 440 nm (s.Abb.10 S. 49).

IR-Spektrum:

$\tilde{\nu}$ = 3333 s, 2941 m, 2326 w, 1600 s, 1550 s, 1504 s, 1449 s, 1351 s, 1290 s, 1258 s, 1205 s, 1170 s, 1117 s, 1081 s, 1036 s, 1000 m, ~980 m, 902 w, 862 m, 826 m, 771 m cm^{-1}

c = 3 mg/800 mg KBr

(s = starke, m = mittelstarke, w = schwache Bande)

Das Spektrum ist deckungsgleich mit dem der Verbindung A (s.Tab.5 S. 48).

δ) Acetylierung des 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxychalkons:

Die bei den letzten 5 Umkristallisationen des synthetischen Chalkons angefallenen Mutterlaugen wurden auf etwa 5 ml eingeengt und 12 Stunden im Eisschrank aufbewahrt, bis sich ein gelber, mikrokristalliner Niederschlag gebildet hatte. Das ausgefallene Chalkon wurde abfiltriert und im Vakuumexsiccator sorgfältig getrocknet (Ausbeute

18 mg der nicht ganz reinen Verbindung); dann wurde es nach der auf S. 71 beschriebenen Methode mit Acetanhydrid und Pyridin acetyliert. Das Acetylprodukt (11 mg) schmilzt bei 152-154°. Der Schmelzpunkt wird durch das Acetat der Verbindung A nicht erniedrigt: der Misch-Schmelzpunkt liegt bei 152-154°.

Elementaranalyse:

Ber. f. $C_{37}H_{38}O_{19}$: C, 56,54; H, 4,88

Gef. : C, 56,96; H, 4,91

3.) Identifizierung der Verbindung B

a) Alkalispaltung:

5 ml 35%ige (8,75 n) Natronlauge wurde 30 Minuten unter Durchleiten von Stickstoff am Rückfluß gekocht. Durch diese Behandlung wurden Lösungsmittel und Apparatur sauerstoffrei gemacht. Dann wurden 3 mg der Verbindung B eingetragen und die violette Lösung unter weiterem Einleiten von Stickstoff 1 Stunde am Rückfluß erhitzt, bis sie nur noch schwach hellbraun gefärbt war. Das erkaltete Reaktionsgemisch wurde unter Eiskühlung mit sauerstoffreier 2 n Schwefelsäure (etwa 20 ml) langsam angesäuert. Die farblose saure Lösung wurde 5 mal mit je 15 ml Aether ausgeschüttelt. Die Aetherphasen wurden gewaschen, mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet, auf 10 ml eingeengt und dann in 4 verschiedenen Systemen chromatographiert. Als Vergleichssubstanzen liefen Gallusaldehyd, Syringaaldehyd und Protocatechualdehyd mit. Der Rf-Wert eines der Spaltprodukte stimmte in allen Systemen genau mit dem des Gallusaldehyds überein (s.Tab.12).

Substanz	Rf im System				Farbe n.d.Bespr. m. GIBBS Reagens
	I	II	III	IV	
Protocatechu-aldehyd	0,65	0,74	0,32	0,22	olivegrün
Syringaaldehyd	0,67	0,95	0,52	0,12	blau
Gallusaldehyd	0,53	0,36	0,10	0,13	grau-grün
Spaltprodukt 1	0,53	0,36	0,10	0,13	grau-grün

I : Papierchromatographie; Essigsäure/Wasser (2,5:97,5)

II : Papierchromatographie; m-Kresol/Essigsäure/Wasser (50:2:48)

III : Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G "Merck"; Dioxan/Benzol/Essigsäure (25:90:4)

IV : Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G "Merck"; n-Butyläther (wassergesättigt)/Essigsäure (90:9)

Tabelle 12

Chromatographischer Vergleich des beim Alkaliabbau der Verbindung B entstandenen Spaltproduktes mit einigen authentischen Aldehyden.

b) Gewinnung des Aglykons F_B:

6 g des Acetontrockenextraktes der Hüllblätter (s.S. 66) wurden wie bei der Isolierung der Verbindungen A und B beschrieben zweimal an Polyamidsäulen chromatographiert. Die Fraktion 2' (s.Abb. 7 S.42) wurde dann auf 25 ml eingeengt, mit 25 ml 2n Salzsäure versetzt und 15 Minuten am Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wurde die Lösung mit Natriumbicarbonat auf p_H 6 gebracht und dann über eine Polyamidsäule (⌀ 2 cm; Höhe der Schicht 15 cm) filtriert. Die Säule wurde mit Wasser (100 ml) gewaschen; dann wurde mit 70%igem Methanol eluiert. Das Eluat wurde mit der Reduktionsprobe (Magnesium und Salzsäure, nach SHINODA 1928) geprüft; alle Fraktionen, bei denen die charakteristische violette Farbe der Flavanone auftrat, wurden vereinigt und im Vakuum bis zur beginnenden Trübung eingeengt. Die trübe Lösung wurde 12 Stunden im Eisschrank aufbewahrt; dann hatte sich das Flavanon als schwach gelber Niederschlag abgeschieden (30 mg). 5 mg dieses Niederschlages wurden dreimal aus 40%igem Methanol um-

kristallisiert und lieferten dann fast farblose Kristalle des Flavanons F_B vom Schmelzpunkt 253-256°.

SHINODA, KAWAGOE u. SATO (1931) geben für das von ihnen synthetisierte 3',4',5,5',7-Pentahydroxyflavanon einen Schmelzpunkt von 250° an.

c) Acetylierung von F_B:

25 mg des F_B-Rohproduktes (s.o.) wurden in 1,5 ml Pyridin gelöst, unter Eiskühlung mit 1 ml Acetanhydrid versetzt und darauf 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dann wurde das Reaktionsgemisch in 15 ml eiskaltes Wasser gegossen. Der sofort ausfallende, zunächst plastische Niederschlag verfestigte sich innerhalb 4 Stunden und wurde dann abgesaugt. Nach gutem Auswaschen mit Eiswasser und sorgfältigem Trocknen im Vakuumexsiccator wurde der Niederschlag 3 mal aus absolutem Aethanol umkristallisiert. Ich erhielt so 16 mg farbloser Kristalle des F_B-Acetats vom Schmelzpunkt 180-181°.

Elementaranalyse:

Ber. f. $C_{25}H_{22}O_{12}$:	C, 58,37;	H, 4,31;	5 Acetyl	, 41,84 %
Gef. :	C, 58,24;	H, 4,39;	Acetyl*)	, 36,90 %

*) saure Verseifung

d) Synthese des 2'-Glucosyloxy-3,4,4',5,6'-pentahydroxychalkons:

2,4 g 2-Tetraacetylglucosido-4-benzoylphloracetophenon (Darstellung s.S. 75) wurden unter Stickstoff im Schlenkrohr mit 2 ml sauerstoffreiem Aethanol+) vermischt; dann wurden unter Eiskühlung 12 ml 10,7 n (60%) sauerstoffreie Kalilauge+) zugefügt und die Mischung 10 Minuten im Eisbad geschüttelt. Als sich eine homogene

---

+) Die Lösungen und Lösungsmittel wurden durch 30minütiges Kochen am Rückfluß unter gleichzeitigem Durchleiten eines kräftigen Stickstoffstromes sauerstoffrei gemacht und nach dem Erkalten mit stickstoffgefüllten Pipetten in das Reaktionsgefäß überführt.

farblose Lösung gebildet hatte, wurden 800 mg Gallusaldehyd und noch 2 ml 10,7 n Kalilauge zugegeben und dann das Schlenkrohr zugeschmolzen. Das verschlossene Gefäß wurde 48 Stunden mechanisch geschüttelt und noch weitere 48 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt; dann wurde es unter Stickstoff geöffnet und der Inhalt unter Eiskühlung mit 16 ml gekühltem sauerstoffreiem Wasser[+)] verdünnt und darauf mit eiskalter sauerstoffreier 10%iger Salzsäure[+)] bis zum Farbumschlag der tiefroten Lösung nach gelb angesäuert (Verbrauch etwa 60 ml). Die saure Lösung wurde noch 30 Minuten im Eisbad belassen; während dieser Zeit hatte sich ein voluminöser farbloser Niederschlag von Benzoesäure abgeschieden, der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde 4 Tage im Eisschrank aufbewahrt. Da das Chalkon auch nach dieser Zeit noch nicht ausgefallen war, wurde die Lösung auf eine Polyamidsäule (⌀ 2,5 cm; Höhe 5 cm) gegeben. Dann wurde mit Wasser (150 ml) nachgewaschen, bis Säure und Salze eluiert waren. Dabei blieb das Chalkon am Säulenkopf als etwa 1 cm breite gelbe Zone adsorbiert, die nach dem Ausstoßen des Säulenmaterials abgetrennt und mit mehreren Portionen kaltem Methanol (insgesamt etwa 150 ml) eluiert wurde. Das Eluat wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit etwa 5 ml heißem Wasser aufgenommen. Die orangefarbene wäßrige Lösung wurde 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt; dann hatte sich ein feiner orangefarbener Niederschlag gebildet, der abfiltriert und 5 mal aus Wasser umkristallisiert wurde. Ich erhielt so 22 mg des Chalkonglykosides in Form kleiner gelber Prismen vom Schmelzpunkt 174-176°. Der Schmelzpunkt wird durch die Verbindung B nicht erniedrigt; der Misch-Schmelzpunkt liegt bei 175-177°.

Das Eutektikum mit Benzanilid liegt bei 161°
Das Eutektikum mit Salophen liegt bei 165°

Durch Umkristallisieren aus konzentrierteren Lösungen, kann man auch die feinen orangefarbenen Nadeln der höherschmelzenden Form (Schmelzpunkt 201-204°) erhalten.

Elementaranalyse:

Ber. f. $C_{21}H_{22}O_{12}$: C, 54,08; H, 4,76

Gef. : C, 53,91; H, 5,23

Die Substanz wurde vor der Analyse bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

UV-Spektrum:

Die Substanz wurde vor der Messung bei 100° im Vakuum getrocknet.

λ_{max}: 213, 246, 255, 325*), 388 nm

ε_{max}: 42600, 8570, 8850, 12100, 29800 $l\ Mol^{-1}cm^{-1}$

$lg\ \varepsilon_{max}$: 4,63; 3,93; 3,95; 4,08; 4,47

$c = 1{,}5 \cdot 10^{-2}\ g\ l^{-1} = 3{,}22 \cdot 10^{-5}\ Mol\ l^{-1}$ in Aethanol

*) Inflexion

Das Spektrum ist identisch mit dem der Verbindung B im Bereich von 210 - 450 nm (s.Abb.12S.53).

IR-Spektrum:

$\tilde{\nu}_{max}$= 3333 s, 2941 m, 2326 w, 1600 s, 1550 s, 1538 s, 1504 s, 1449 s, 1333 s, 1274 s, 1205 s, 1156 s, 1081 s, 1036 s, 1000 m, 980 m, 902 w, 862 m, 840 m, 771 m, cm^{-1}

s = starke, m = mittelstarke, w = schwache Bande

Das Spektrum ist identisch mit dem der Verbindung B im Bereich von 4000 - 700 cm^{-1}. (s.Tab. 6, S. 52)

VI Diskussion:

Wie in der Einleitung dargelegt wurde, sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit dazu dienen, die auf Grund unserer Hypothese erwarteteKorrelation des Vorkommens lipophiler Flavonoide mit dem Vorhandensein von Drüsen, d.h. mit der Möglichkeit zur glandulotropen Exkretion, an einem Beispiel zu demonstrieren. An einem anderen Beispiel soll gezeigt werden, daß die Möglichkeit zur chymotropen Exkretion mit dem Vorkommen hydrophiler Flavonoide korreliert ist. Dazu ist zunächst festzustellen, welche Exkretionsmechanismen bei den untersuchten Pflanzenteilen vorhanden sein können: Von Helichrysum bracteatum war bereits bekannt (KLEIN, 1921), daß die jungen, noch lebenden Hüllblätter Anthochlorpigmente (Aurone und/oder Chalkone) im Zellsaft gelöst enthalten+). Das bedeutet also, daß diese Farbstoffe hier chymotrop ausgeschieden werden. Eine zusätzliche glandulotrope Exkretion sollte nicht möglich sein, da die Hüllblätter keine anatomisch differenzierten Drüsen besitzen. Auf den Blättern von Vitex agnus castus befinden sich demgegenüber viele Drüsenhaare. Diese Blätter sollten also zusätzlich zur immer vorhandenen Möglichkeit der chymotropen Exkretion auch die Möglichkeit zur glandulotropen Exkretion besitzen.

Betrachtet man nun die jetzt vollständige Liste der in Helichrysum bracteatum und in Vitex agnus castus vorkommenden Flavonoide und vergleicht die Flavonoidführung mit den jeweils

---

+) Obwohl die Farbstoffe später in den ausgewachsenen Hüllblättern, an denen ich meine Untersuchungen durchführte, in der Membran der abgestorbenen Zellen adsorptiv gespeichert werden, verliert diese Aussage wohl nicht an Wert.

vorhandenen Möglichkeiten der Exkretion, so ergibt sich ein klares Bild, das unseren Erwartungen entspricht:

Untersuchte Art (Pflanzenteil)	nachgewiesene Flavonoide		Drüsen	Mö ke ch
	lipophile Flavonoide	hydrophile Flavonoide		
Helichrysum bracteatum (Hüllblätter)	-	Orientin, Homo-Orientin, Luteolin-7-glucosid, (Quercetin)[a], Bractein[b), c)], 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxychalkon, 2'-Glucosyloxy-3,4,4',5,6'-pentahydroxychalkon[a,d)]	-	
Vitex agnus castus (Blätter)	Casticin[e)] (= 3',5-Dihydroxy-3,4',6,7-tetramethoxyflavon)[d), f)]	Luteolin-7-glucosid[e)], Homo-Orientin[e, d)]	+	

a) FRENZEL 1963
b) ALBRECHT 1962
c) HÄNSEL u. LANGHAMMER 1963
d) Eigene Untersuchungen
e) SIRAIT 1961
f) BELIC, BERGANT-DOLAR u. MORTON (

Die Hüllblätter von Helichrysum bracteatum, bei denen die Möglichkeit zur glandulotropen Exkretion nicht vorhanden ist, enthalten nur hydrophile Flavonoide[+)] ; insbesondere die Anthochlore, deren chymotrope Exkretion ja bei den jungen Hüllblättern nachgewiesen ist (s.o.), sind ausnahmslos sehr hydrophile hoch-

---

+) Das Quercetin wurde in der Tabelle in Klammern gesetzt, da es Aglykon weniger hydrophil als die außerdem aufgeführten Flavon glykoside ist. Auf Grund der vielen (5) freien Hydroxygruppen Molekül ist jedoch unserer Meinung nach die Wasserlöslichkeit Verbindung gut genug, um die Zuordnung zu den "hydrophilen" Fl vonoiden zu rechtfertigen.

hydroxylierte Auron- oder Chalkonglykoside. Dagegen enthalten die Blätter von Vitex agnus castus, die neben der Möglichkeit zur chymotropen Exkretion auch die Möglichkeit zur glandulotropen Exkretion besitzen, bezeichnenderweise neben den hydrophilen Flavonglykosiden ein lipophiles hochmethyliertes Flavonaglykon (Casticin). Hier ist also tatsächlich das Vorkommen der hydrophilen Flavonoide mit der Möglichkeit zur chymotropen und das Vorkommen des lipophilen Flavonoids mit der Möglichkeit zur glandulotropen Exkretion korreliert. Diese Korrelationen sind sehr wahrscheinlich der Ausdruck eines funktionalen Zusammenhanges ("Exkret"-"Exkretionsmechanismus") der Merkmalspaare.

Bezieht man auch andere bereits untersuchte Vitex-Arten in diese Betrachtungen ein, so zeigt sich, daß die angeführten Beispiele keinen Einzelfall darstellen: So kommt das lipophile Flavon auch in den Blättern zweier weiterer Vitex-Arten (V. trifolia und V. negundo), die ebenfalls viele Drüsenhaare besitzen (BREITWIESER, 1942), vor (SIRAIT, 1961). Es läßt sich dagegen in den Blättern einer vierten Vitex-Art (V. megapotamica), auf denen sich nur sehr wenige Drüsenhaare finden, nicht nachweisen (SCHAAF, 1964).

Die taxonomische Wertigkeit derartiger chemischer Merkmale, die mit morphologischen Merkmalen korreliert sind, ist, wie in der Einleitung dargelegt wurde, gering; denn in diesem Fall sind die beiden Einzelmerkmale taxonomisch als ein komplexes Merkmal zu werten. Da das morphologische Merkmal im allgemeinen bekannt ist, ist es dann ohne Bedeutung, ob man auch das damit korrelierte chemische Merkmal kennt oder nicht. Das gilt allerdings nur, wenn die Korrelation Ausdruck eines funktionalen Zusammenhangs beider Merkmale ist; denn wenn die Korrelation auf gemeinsame Selektion und evolutionäre Divergenz zurückzuführen ist, kann das sogar besonders wertvoll für die phylogenetische Systematik sein (HARBORNE, 1964). Derartige phylogenetische Parallelentwicklungen lassen sich jedoch schwer nachweisen; dagegen kann in vielen Fällen ein funktionaler Zusammenhang zweier korrelierter Merkmale sehr wahrscheinlich gemacht werden. Man sollte daher, wenn man chemische Merkmale zur Klärung taxonomischer

Fragen heranzieht, auch auf solche funktionalen Zusammenhänge mit morphologischen Merkmalen achten, um Fehlinterpretationen der Untersuchungsergebnisse zu vermeiden.

Allerdings muß betont werden, daß die dargestellten Überlegungen nur für das chemische Merkmal "Vorkommen eines lipophilen (bzw. hydrophilen) Flavonoids" gelten und nicht für das Vorkommen einer definierten chemischen Verbindung. Es ist also durchaus möglich, daß etwa ein bestimmtes lipophiles Flavonoid für ein Taxon charakteristisch ist, obwohl sein Vorkommen auf Grund der Lipophilität mit dem Vorhandensein von Drüsen korreliert ist. Das trifft z.B. auch für das Casticin zu. Diese Verbindung ist außerhalb der Gattung **Vitex** bisher nicht nachgewiesen worden, sie scheint also für dieses Taxon charakteristisch zu sein. Innerhalb der Gattung kommt sie jedoch nur bei solchen Arten vor, die auch Drüsen mit aetherischem Öl führen (V. agnus castus, V. trifolia, V. negundo); sie ist dagegen in einer Art, die nur sehr wenige Drüsen führt (V. megapotamica), nicht nachweisbar.

VII Zusammenfassung:

Zwei Flavonoide, die von SIRAIT (1961) aus den Blättern von Vitex agnus castus L. isoliert und teilweise charakterisiert wurden, konnten identifiziert werden: Die Verbindung F_1 erwies sich als Homo-Orientin (6- [oder 8-] Glucopyranosyl-3',4',5,7-tetrahydroxyflavon); die Verbindung F_3 erwies sich als 3',5-Dihydroxy-3,4',6,7-tetramethoxyflavon (= Casticin).

Zwei neue Chalkonglykoside, die FRENZEL (1963) in den Hüllblättern einer gelben Sorte von Helichrysum bracteatum nachwies und von denen er eines (Verbindung B) in geringer Menge isolieren und teilweise charakterisieren konnte, wurden nach einem anderen Verfahren in ausreichender Menge aus der gleichen Droge gewonnen. Die Struktur beider Verbindungen wurde auf analytischem Wege ermittelt und durch Synthese bewiesen: Es handelt sich um das 2'-Glucosyloxy-3,4,4',6'-tetrahydroxychalkon (Verbindung A) und um das 2'-Glucosyloxy-3,4,4',5,6'-pentahydroxychalkon (Verbindung B).

Die Untersuchungsergebnisse werden zusammen mit schon früher gewonnenen Kenntnissen anderer Autoren dazu benutzt, die taxonomische Wertigkeit chemischer Merkmale zu diskutieren.

Literaturverzeichnis

ALBRECHT, A.G.: Untersuchungen über Begleitstoffe in Helichrysum-Arten, Dissertation FU Berlin 1962

ANTEUNIS, M.: Verh. Kon. vlaamse Acad, Wetensch., Letteren schone Kunsten Belgie, Kl. Wetensch. 22, Nr. 64 (1960)

BAKER, W., NODZU, R. u. ROBINSON, R.: J. chem. Soc. [London] (1929), 74 ff

BELIC, I., BERGANT-DOLAR, J. u. MORTON, R.A.: J. chem. Soc. [London] (1961), 2523

BENTHAM, G.: Flora Australiensis, London 1866, Vol.III, p. 620

BREITWIESER, K.: Pharmakognostische Untersuchungen über Verbenaceae; Habilitationsschrift Braunschweig 1942

BRIGGS, L.H. u. CAMBIE, R.C.: Tetrahedron [London] 3, 269 (1958)

BRIQUET, J. in ENGLER u. PRANTL: Natürliche Pflanzenfamilien IV, 3a (1897) p. 136 ff.

CANTER, F.W., CURD, F.H. u. ROBERTSON, A.: J. chem. Soc. [London] (1931), 1245

CEKAN, Z. u. HEROUT, V.: Collect. czechoslov. chem. Commun. 21, 79 (1956)

CHOPIN, J., CHADENSON, M. u. BOUILLANT, M.-L.: C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 255, 3427 (1962)

DEAN, F.M.: Naturally Occuring Oxygen Ring Compounds, Butterworths London 1963, p. 291 f, 336 ff u. 344 f

EIGEN, E., BLITZ, M. u. GUNSBERG, E.: Arch. Biochem. Biophys. 68, 501 (1957)

FIESER, L.F. u. M.: Lehrbuch der organischen Chemie, 3.Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1957, p. 793

FRENZEL, H.-J.: Zur infraspezifischen Variabilität: Flavonoide in Helichrysum bracteatum (Vent.) Willd., Dissertation FU Berlin 1963

GEISSMAN, T.A. in PAECH, K. u. TRACEY, M.V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Springer Verlag, Berlin 1955, Bd. III, p. 462 u. 492 ff

GEISSMAN, T.A. u. CLINTON, R.O.: J. Amer. chem. Soc. 68, 699 (1946)

HÄNSEL, R.: Planta medica 10, 361 (1962)

HÄNSEL, R. u. LANGHAMMER, L.: Arch. Pharmaz. 296, 619 (1963)

HARBORNE, J.B. u. SIMMONDS, N.W. in HARBORNE, J.B.: Biochemistry of Phenolic Compounds, Academic Press London 1964, p. 109

HERZ, W.: J. org. Chem. 26, 3014 (1961)

HERZIG (1894): zit. n. VENKATARAMAN (1962)

HÖRHAMMER, L., WAGNER, H., NIESCHLAG, H. u. WILDI, G.: Arch. Pharmaz. 292, 380 (1959)

HOROWITZ, R.M. u. GENTILI, B.: Chem. and Ind. (1964) 498

JURD, L. in GEISSMAN, T.A.: The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Press Oxford 1962, p. 107 ff

KARRER, W.: Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Birkhäuser Verlag Basel 1958, p. 644

KLEIN, G.: S.-B. Akad. Wiss. Wien, Math.-Nat. Kl. Abt. I, 129, 341 (1920)

KLEIN, G.: S.-B. Akad. Wiss. Wien, Math.-Nat. Kl. Abt. I, 130, 247 (1921)

KOEPPEN, B.H.: South African med. J. 38, 154 (1964); vergl. Z. Naturforsch. 19 b, 173 (1964)

KOEPPEN, B.H. u. ROUX, D.G.: South African med. J. 38, 154 (1964)

KOEPPEN, B.H., SMIT, C.J.B. u. ROUX, D.G.: Biochem. J. 83, 507 (1962)

KOSTANECKI, St. v.: Ber. dtsch. chem. Ges.: 26, 2901 (1893)

MOLDENKE, H.N.: Phytologia 5, 146 (1955 a)

MOLDENKE, H.N.: Phytologia 5, 166 (1955 b)

MOLDENKE, H.N.: Phytologia 5, 466 (1957 a)

MOLDENKE, H.N.: Phytologia 5, 489 (1957 b)

MOLDENKE, H.N.: Phytologia 6, 168 (1958)

NARASIMHACHARI, N. u. SESHADRI, T.R.: Proc. Indian Acad. Sci. 27A, 223 (1948) ; ref. C. A. 44, 1493 (1950)

NEU, R.: Arch. Pharmaz. 293, 169 (1960)

PEW, J.C.: J. Amer. chem. Soc. 70, 3031 (1948)

PICCARD (1877): zit. n. VENKATARAMAN (1962)

RAMANATHAN, J.D. u. SESHADRI, T.R.: Current Sci. 29, 131 (1960); ref. C. A. 54, 22616 (1960); vergl.: RAO, Ch.B. u. VENKATESWARLU, V.: J. sci. ind. Res. [New Delhi] 21B, 313 (1962)

REZNIK, H.: Proc. 4th int. Congr. Biochem. Vienna, London 1959, Vol. 2, p. 70

REZNIK, H.: Ergebn. Biol. 23, 14 (1960)

ROSENMUND, K.W. u. M.: Ber. dtsch. chem. Ges. 61, 2608 (1928)

ROSOLL, A.: S.-B. Akad. Wiss. Wien, Math.-Nat. Kl., Abt. I,89, 137 (1884

SCHAAF, K.D.: Beiträge zur Chemotaxonomie der Gattung Vitex, Dissertation FU Berlin 1964

SEIKEL, M.K. u. BUSHNELL, A.J.: J. org. Chem. 24, 1995 (1959)

SEIKEL, M.K. u. GEISSMAN, T.A.: Arch. Biochem. Biophys. 71, 17 (1957)

SEIKEL, M.K. in GEISSMAN, T.A.: The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Press Oxford 1962, p. 57

SHIMOKORIYAMA, M.: J. amer. chem. Soc. 79, 4199 (1957)

SHINODA, J.: J. Pharmac. Soc. Japan 48, 214 (1928)

SHINODA, J.; KAWAGOE, M. u. SATO, D.: J. Pharmac. Soc. Japan 51, 249 (1931); ref. C. A. 25, 3979 (1931)

SHINODA, J. u. SATO, S.: J. Pharmac. Soc. Japan 48, 109 (1928)

SIRAIT, M.: Phytochemisch-pharmakognostische Untersuchungen einiger Vitex-Arten, Dissertation FU Berlin 1961

SIRAIT, M., RIMPLER, H. u. HÄNSEL, R.: Experientia (Basel) 18, 72 (1962)

SONN, A. u. BÜLOW, W.: Ber. dtsch. chem. Ges. 58, 1691 (1925); vergl.: SONN,A.: Ber. dtsch. chem. Ges. 52, 255 (1919) und

MOSIMANN, W. u. TAMBOR, J.: Ber. dtsch. chem. Ges. 49, 1700 (1916)

SYKES, P.: Reaktionsmechanismen der organischen Chemie, eine Einführung, Verlag Chemie, Weinheim 1964, p. 113 u. 151

TIROUFLET, J. u. CORVAISIER, A.: C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 252, 3818 (1961)

TIROUFLET, J. u. CORVAISIER, A.: Bull. Soc. chim. France (1962), 540

TRIM, A.R. in PAECH, K. u. TRACEY, M.V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Springer Verlag Berlin 1955, Bd. II, p. 301 ff

VENTAKARAMAN, K. in GEISSMAN, T.A.: The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Press Oxford 1962, p. 70 ff

WETTSTEIN, R.: Handbuch der Systematischen Botanik, 4. Aufl., Verlag F. Deuticke Leipzig 1935, p. 20

WINDE, E. u. HÄNSEL, R.: Arch. Pharmaz. 293, 556-567 (1960)

ZEMPLEN, G. u. BOGNAR, R.: Ber. dtsch. chem. Ges. 75, 1040 (1942)

Lebenslauf

Am 22. September 1935 wurde ich, Carl-Heinz Horst Rimpler, Sohn des Apothekers Carl-Friedrich Rimpler und seiner Ehefrau Margarete geb. Jurk, in Berlin geboren.

Im September 1942 wurde ich in die 25. Grundschule in Berlin-Neukölln eingeschult. Im August 1943 wurde ich nach Regensburg und Ostern 1944 nach Wustrow auf Fischland evakuiert. Ich besuchte dort die Grundschulen. Von Juni 1945 bis zum Herbst 1946 setzte ich den Unterricht in der 25. Grundschule Berlin-Neukölln fort und trat dann in die Albert-Schweitzer-Schule ein. Hier konnte ich im März 1955 meine Reifeprüfung ablegen.

Am 18. Oktober 1952 starb mein Vater nach einer Operation.

April 1955 begann ich in der Marien-Apotheke in Berlin die praktische Ausbildung, die ich 1957 mit dem Vorexamen abschloß.

Zum Sommersemester 1957 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Berlin, das ich nach 2 Semestern an der Freien Universität Berlin fortsetzte. Nach 6-semestrigem Studium bestand ich im Frühjahr 1960 das Staatsexamen.

Seit Mai 1960 beschäftigte ich mich mit der vorliegenden Arbeit unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R. Hänsel am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin. Seit Januar 1962 war ich als wissenschaftlicher Hilfsassistent am selben Institut tätig. Am 1. Juli 1964 wurde ich mit der Wahrnehmung der Dienstgeschäfte eines Wissenschaftlichen Assistenten beauftragt.

Die Approbation als Apotheker erhielt ich im Mai 1961.

Ich bin verheiratet und habe ein Kind.